

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

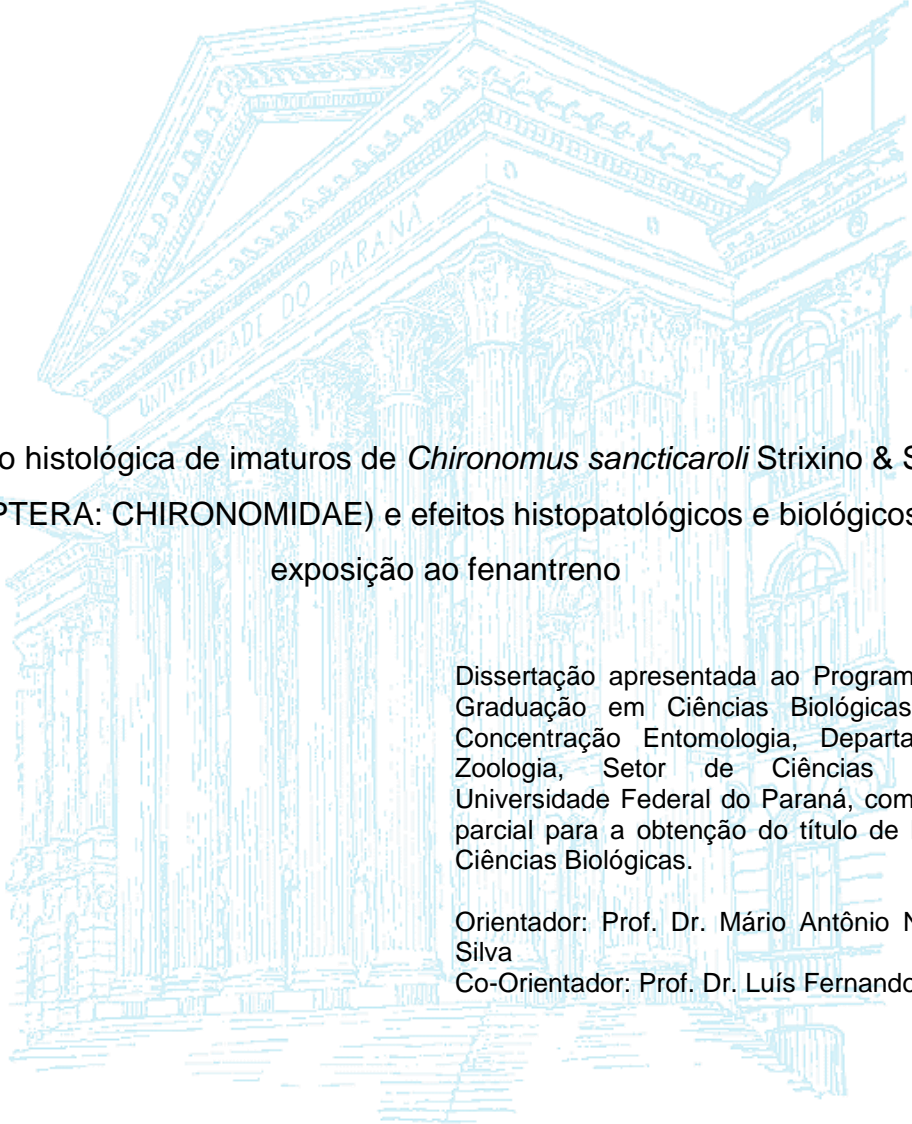
VINICIUS SOBRINHO RICHARDI

Descrição histológica de imaturos de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) e efeitos histopatológicos e biológicos após a exposição ao fenantreno

CURITIBA

2013

VINICIUS SOBRINHO RICHARDI



Descrição histológica de imaturos de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) e efeitos histopatológicos e biológicos após a exposição ao fenantreno

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas Área de Concentração Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Fávaro

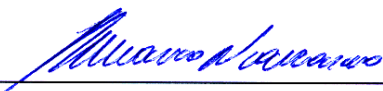
CURITIBA

2013

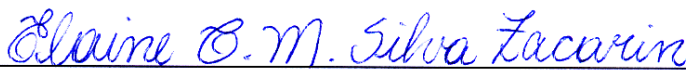
VINICIUS SOBRINHO RICHARDI

“Descrição histológica de imaturos de *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) e efeitos histopatológicos e biológicos após a exposição ao fenantreno”

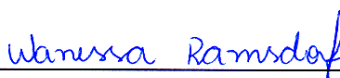
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva (Orientador)
(UFPR)



Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin
(UFSCAR)



Profa. Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf
(UTFPR)

Curitiba, 18 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mário Navarro, pela orientação, paciência, conselhos, disponibilização da laboratório e mais do que isso, pela confiança depositada e acreditar no potencial do projeto.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Fávaro (Biologia Celular), pela co-orientação, disponibilização do seu laboratório e principalmente na correção e auxílio com a histologia.

À Prof^a Dr^a. Thelma Veiga Ludwig (Botânica) pela disponibilização do fotomicroscópio.

Ao Prof. Dr. José Manoel Reis e aos técnicos Elisiane, Evenlyn, Francieli e Rodrigo do LAMIR por toda a ajuda e acompanhamento na análise do sedimento.

À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Conselho nacional de Pesquisa (CNPq) e professores por toda a estrutura fornecida para a realização do trabalho, formação e pela concessão da bolsa.

Aos colegas da Pós-graduação, especialmente à Carla, Diego, Gabriela e Tatiana2w, amigos do Laboratório de Ecologia de Rios, especialmente a Ana, Fagner, Karine e Suelen que mesmo a distância sempre me apoiaram solucionando dúvidas e ao Diego e Jeferson do Laboratório de Reprodução e Comunidade de Peixes pelos ensinamentos histológicos e paciência. Aos meus colegas do LEMV: Adriana, Ana, Ana Júlia, Betina, Gerson, Lígia, Mário, Oscar e Rodrigo por todos os momentos de convivência, aprendizado, discussões e descontrações, à equipe que trabalha com Chironomidae no laboratório: à Maiara por toda a ajuda durante a parte histológica do trabalho, à Gisele por conceder as concentrações letais do fenantreno. E especialmente à Débora, pelas incansáveis discussões para a melhoria do projeto, apoio, confiança e eterna amizade, você foi essencial, e se tornou uma irmã para mim!

Aos meus queridos amigos de Curitiba: Adriana, Ana Claudia, André, Andreas, Brenda, Carolina, Clarissa, Daniela, Fernando B., Fernando S., Gabriel, Juliana, Ligia, Lucimary, Luísa, Samuel, Talles, Thalita e Tiago, vocês não estavam sempre tão perto, mas sempre me deram muito apoio. E em especial ao Antônio, Camila, Diego, Fábio, Karin e Vanessa que praticamente diariamente me apoiavam, acalmavam e me distraíam. Queridos, obrigado pela amizade sincera, por suportarem minhas reclamações, queixas e desesperos, vocês foram essenciais para que eu alcançasse mais esta etapa! Vocês tornaram-se o que há de melhor pra mim em Curitiba, uma verdadeira família.

E por fim, mas não menos importante a toda minha família: avós, tios, primos, e especialmente aos meus pais Antônio e Filomena e minha irmã Laís, que mesmo de longe, sempre me apoiaram, me enviando mensagens de amor e carinho. Amo vocês.

Vinicius

RESUMO

Imaturos de Chironomidae são considerados bioindicadores de qualidade de sedimentos em ecossistemas aquáticos. A utilização de biomarcadores histopatológicos para compreender os efeitos de xenobióticos nestes organismos pode nos fornecer indícios da qualidade ambiental, porém não existem descrições histológicas recentes do grupo, o que enfatiza também a necessidade de estudos histológicos. O objetivo do trabalho foi descrever a histologia da larva de *Chironomus sancticaroli* e avaliar alterações na estrutura histológica e no desenvolvimento causadas pela exposição ao hidrocarboneto fenantreno. Os organismos utilizados foram provenientes de colônia matriz do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná mantida em sala de criação com controle de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$), fotoperíodo (12h claro:12h escuro) e umidade (80%). Para o padrão histológico foram utilizadas 30 larvas da colônia que foram fixadas em solução Dubosq para insetos a 56°C , seguido de processamento histológico de rotina com emblocagem em parafina, obtendo-se cortes que foram corados com Hematoxilina-Eosina. A sensibilidade dos organismos da colônia foi avaliada através de testes de sensibilidade ao KCl e o sedimento utilizado nos bioensaios passou por análises químicas e mineralógicas. Foram realizados bioensaios de toxicidade aguda com fenantreno utilizando 10 larvas de 3º ínstar final/4º ínstar inicial nas quatro réplicas de cada concentração, com duração de 96h em câmaras tipo BOD, com as concentrações letais (CLs) calibradas anteriormente CENO (concentração de efeito não observado) de (0,12 mg/L), CL₂ (0,6 mg/L), CL₁₀ (0,78 mg/L), CL₃₀ (1,01 mg/L) e CL₅₀ (1,2 mg/L). Os bioensaios de toxicidade crônica foram conduzidos com as concentrações CENO, CL₂ e CL₁₀ iniciando com 20 larvas de 1º ínstar por réplica sendo quatro por concentração alimentadas com ração Tetramin®, sob aeração constante, com duração de oito dias, período em que as larvas do controle atingiram o 4º ínstar final, com renovação da água e contaminante a cada 48 horas, utilizando areia como sedimento em ambos ensaios. Nas larvas sobreviventes foram realizadas análises histológicas, segundo protocolo descrito anteriormente, utilizando 10 exemplares por concentração, e nos bioensaios de toxicidade crônica o desenvolvimento larval foi avaliado medindo o tamanho do corpo e da antena da larva. Foi descrito a histologia dos principais sistemas: digestório e glândulas anexas, excretor, circulatório, nervoso e tegumentar. Nos bioensaios de toxicidade aguda foram observadas alterações teciduais nas concentrações CL₂, CL₁₀, CL₃₀ e CL₅₀ e nos bioensaios de toxicidade crônica ocorreram alterações em todas as concentrações. As principais modificações observadas ocorreram em células da região III do intestino médio e células de Cuénot como a diminuição da borda em escova e rompimento da região apical das células; nos túbulos de Malpighi foi possível observar diminuição da borda em escova e nos trofócitos do corpo gorduroso observaram-se alterações nucleares, as alterações mostraram-se dose-dependentes. Foram também observados efeitos na exposição crônica no tamanho do corpo e da antena, demonstrando que ocorreram alterações no desenvolvimento larval. O hidrocarboneto fenantreno causou alterações teciduais mesmo em baixas concentrações em *C. sancticaroli* em exposição aguda e crônica. Estas modificações provavelmente alteram a fisiologia do organismo que a longo prazo podem refletir na dinâmica populacional da espécie.

Palavras-chaves: Biomarcadores histológicos; desenvolvimento larval; fenantreno.

ABSTRACT

Immatures of family Chironomidae are considered bioindicators of sediment quality in aquatic ecosystems. Using histological biomarkers to understand the effects of xenobiotics in these organisms can provide some evidence of environmental quality, but there are no recent histological descriptions of the group, which also emphasizes the need for histological studies. The objective of this study was to describe the histology of the larva of *Chironomus sancticaroli* and evaluate changes in histological structure and development caused by exposure to hydrocarbon phenanthrene. The organisms used were from the colony in "Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária" kept in room setting with controlled temperature ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$), photoperiod (12 h light: 12h dark) and humidity (80%). For the histological pattern was used 30 larvae colony that were fixed in Dubosq for insects at 56°C , followed by routine histologic processing with paraffin inclusion, obtaining sections that were stained with hematoxylin-eosin. The colony was assessed by testing sensitivity to KCl and the sediment used in bioassays underwent chemical and mineralogical analysis. Bioassays were performed for acute toxicity with phenanthrene using 10 larvae 3rd instar end / 4th instar initial per replica (four replicates per concentration), lasting 96 hours in BOD chambers with lethal concentrations (LCs) calibrated previously: NOEC - not observed effect concentration (0.12 mg / L), LC₂ (0.6mg / L), LC₁₀ (0.78 mg / L), LC₃₀ (1.01 mg / L) and LC₅₀ (1.2 mg / L). The bioassays of chronic toxicity were conducted with concentrations NOEC, LC₂ and LC₁₀ starting with 20 larvae 1st instar by replica (four replicates per concentration) fed diet TetraMin®, under constant aeration, for eight days, during which time larvae control reached the end of 4th instar, with water renewal and contaminant every 48 hours, using sand as sediment in both trials. In surviving larvae were performed histological, according to the protocol described above, using 10 copies per concentration, and chronic toxicity bioassays larval development was evaluated by measuring the body size and the antenna of the larva. It described the histology of the major systems: digestive and accessory glands, excretory, circulatory, nervous and integumentary. In acute toxicity bioassays were observed tissue changes in the concentrations CL2, CL10, CL30 and CL50 and on chronic toxicity bioassays were no changes at all concentrations. The main changes were observed in the region III cells of the midgut cells and Cuénot as decreased brush border and disruption of the apical region of the cell; Malpighian tubules was observed decrease in brush border and in the fat body trophocytes observed nuclear alterations, changes proved dose-dependent. We also observed the effects of chronic exposure and body size of the antenna, showing that alterations in larval development. The hydrocarbon phenanthrene tissue changes caused even at low concentrations *C. sancticaroli* in acute and chronic exposure. These changes likely alter the physiology of the body which may reflect the long-term population dynamics of the species.

Key-words: Histological biomarkers, larval development, phenanthrene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Ciclo de vida de <i>Chironomus sancticaroli</i>	06
Figura 2:	Estrutura química do hidrocarboneto fenantreno.....	08
Figura 3:	Aquários utilizados para a criação da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> em sala de criação com condições controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($80 \pm 10\%$) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro). A: aquário 85L e b: aquário 10L.	15
Figura 4:	Sala de criação com imagens das bandejas utilizadas para a separação das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> para estudo do padrão histológico e realização dos bioensaios. A: aspecto geral da disposição das bandejas na sala e b: detalhe da bandeja contendo larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial e aeração constante.....	16
Figura 5:	Representação esquemática dos testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de potássio (KCl) em larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial para avaliar a qualidade da população de <i>Chironomus sancticaroli</i> mantida em laboratório. Foram utilizadas cinco concentrações mais o controle com água, cada tratamento apresentou três réplicas, cada uma contendo seis larvas da espécie.	18
Figura 6:	Representação esquemática dos bioensaios de toxicidade aguda com o hidrocarboneto fenantreno em larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial de <i>Chironomus sancticaroli</i>	19
Figura 7:	Representação esquemática dos bioensaios de toxicidade crônica com o hidrocarboneto fenantreno mais o controle contendo álcool, durante a fase larval de <i>Chironomus sancticaroli</i>	20
Figura 8:	Concentrações Letais CL50 – 96h (g/L) para cada um dos 13 testes realizados, bem como o limite superior e inferior da faixa sensibilidade de <i>Chironomus sancticaroli</i> ao Cloreto de Potássio (KCl).	23
Figura 9:	Difratograma com os picos padrões do quartzo, microclínio e albita, presentes no sedimento utilizado no cultivo e bioensaios com <i>Chironomus sancticaroli</i>	24
Figura 10:	Representação esquemática da morfologia interna da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> com os principais sistemas e órgãos avaliados.	34
Figura 11:	Representação esquemática sistema digestório da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> evidenciando as regiões funcionais.	35
Figura 12:	Região do esôfago da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> . a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: corte longitudinal da região cefálica da larva, em destaque o esôfago (seta). d: corte longitudinal do esôfago com os anéis musculares ou colar	

	periesofageano (seta). e: corte longitudinal do esôfago evidenciando o epitélio de revestimento (seta) f: corte transversal no esôfago com as cristas longitudinais formadas pelo epitélio (seta) e a camada muscular longitudinal. g: corte transversal no esôfago na região do cérebro demonstrando o complexo círculo-esofageano. cm: camada muscular; dv: divertículo; es: esôfago; gsb: gânglio subesofageano; gsp: glânglio supra-esofageano (cérebro) e tr: traquéia. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	36
Figura 13:	Região da válvula estomodeal da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> . a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: corte transversal da região dos cecos da larva, observar as células de Cuénot (seta), células dos cecos (cabeça de seta) e esôfago. d: em detalhe células de Cuénot. e: em detalhe células dos cecos gástricos. f: corte longitudinal da região dos cecos evidenciando a válvula estomodeal. g: corte longitudinal da válvula estomodeal demonstrando a região produtora da matriz peritrófica (seta). be: bordo em escova; cc: células de Cuénot; ce: células dos cecos; es: esôfago; gs: glândula salivar; ie: invaginação esôfago e mu: músculo. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	37
Figura 14:	Região I do intestino médio da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> . a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: corte transversal da região I do intestino médio. d: corte longitudinal da região I do intestino médio. e-f: célula formadora do epitélio da região I do intestino médio, demonstrando o bordo em escova (seta) e a eosinofilia apical e basal da célula (cabeça de seta). al: alimento; ce: cecos; ep: epitélio; lu: lúmen do intestino. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	38
Figura 15:	Região II do intestino médio da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> . a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c-e: corte transversal da região II do intestino médio, sendo possível observar o bordo em escova (seta) e a matriz peritrófica (cabeça de seta). est: estrias aparentes formadas por invaginações da membrana não coradas e mc: camada muscular circular. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	39
Figura 16:	Região III do intestino médio da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> . a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c-f: corte transversal da região III do intestino médio, sendo possível observar o bordo em escova (seta), células em processo de secreção (cabeça de seta) e células regenerativas. al: alimento; cr: células regenerativas; est: estrias aparentes formadas por invaginações da membrana não coradas. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	40

- Figura 17: Região valvular do intestino posterior da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c,e: corte transversal do epitélio de transição entre intestino médio e posterior. d,f: corte longitudinal da região de transição entre intestino médio e posterior, demonstrando a válvula proctodeal (seta). al: alimento; ep: epitélio; epv: epitélio válvula; mlp: túbulos de Malpighi e mp: matriz peritrófica. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.41
- Figura 18: Região do íleo no intestino posterior da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c-d: cortes transversais do íleo evidenciando a densa camada muscular e as vilosidades formadas pelo epitélio (seta). cm: camada muscular; mlp: túbulos de Malpighi e mu: músculo. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.42
- Figura 19: Região do colón e reto no intestino posterior da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c-d: corte transversal do epitélio do colón e reto demonstrando a eosinofilia basal da célula (seta). e: corte longitudinal do reto evidenciando o conteúdo basófilo (cabeça de seta). co: coração. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.43
- Figura 20: Glândula salivar da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização da glândula salivar na larva. b: esquema detalhado da glândula salivar. c,e: corte tangencial da glândula salivar evidenciando partes do lúmen contendo a secreção (seta) e as células, destacando o núcleo com cromossomos politênicos (cabeça de seta). d: corte longitudinal do ducto da glândula salivar, observar a presença de conteúdo no lúmen (*). eso: esôfago. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.44
- Figura 21: Túbulos de Malpighi da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização dos túbulos na larva b: esquema demonstrando a disposição e local de inserção dos túbulos nos sistema digestório (setas). c: corte transversal dos túbulos com o lúmen e o bordo em escova (seta). d: corte longitudinal evidenciando o local de inserção de um túbulo no sistema digestório. e-f: corte longitudinal de um túbulo com o bordo em escova (seta) e a projeção da porção citoplasmática contendo o núcleo para o lúmen (cabeça de seta). im: intestino médio; ip: intestino posterior; lu: lúmen do túbulo e ri: região de inserção. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.45
- Figura 22: Sistema nervoso da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema nervoso na larva. b: esquema da anatomia dos principais componentes do sistema nervoso. c: corte longitudinal do cérebro demonstrando a região cortical e

	neurópila d: corte longitudinal de um gânglio da corda nervosa e um feixe conectivo formado por axônios. e: corte longitudinal evidenciando o cérebro (cabeça de seta) e os gânglios torácicos e o primeiro abdominal da cadeia nervosa ventral (seta). f: corte transversal do cérebro. g: corte longitudinal da região cefálica da larva com destaque no gânglio frontal (círculo), anterior ao cérebro. cc: camada cortical; cn: conectivo; eso: esôfago; g: gânglio; gs: glândula salivar; ln: lamela neural; ne: neurópila; pe: perineuro e tb: trofoblasto. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	46
Figura 23:	Representação esquemática do complexo retrocerebral da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> , demonstrando as principais glândulas.....	47
Figura 24:	Glândulas do complexo retrocerebral da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> . a: localização do complexo retrocerebral na larva. b: em destaque, no círculo, regiões tratadas nas micrografias. c-d: corte longitudinal da corpora allata demonstrando o epitélio glandular. e-f: corte longitudinal da glândula protorácica. ao: aorta; ca: corpora allata; eso: esôfago; gp: glândula protorácica e tr: traquéia. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	48
Figura 25:	Glândulas do complexo retrocerebral da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> . a: localização do complexo retrocerebral na larva. b: em destaque, no círculo, regiões tratadas nas micrografias. c: corte longitudinal da região do complexo demonstrando a glândula poscerebral anterior e o pequeno grupo de células que compõem a corpora cardíaca. d: detalhe da glândula poscerebral anterior, notar granulações no seu citoplasma (cabeça de seta) e: detalhe do pequeno grupo de células que compõem a corpora cardíaca (setas). cco: corpora cardíaca; ce: cérebro; di: discos imaginais; eso: esôfago; ga: glândula poscerebral anterior e tr: traquéia. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	49
Figura 26:	Corpo gorduroso da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> . a: localização do corpo gorduroso na larva. b: esquema da disposição desse órgão na larva. c-d: corte longitudinal do corpo gorduroso demonstrando o corpo gorduroso parietal e visceral. e: em detalhe os trofócitos do corpo gorduroso visceral, células que estão em maior quantidade neste tecido, notar o citoplasma perinuclear (cabeça de seta) e os vacúolos preenchendo o citoplasma da célula (setas) .cgp: corpo gorduroso parietal; cgv: corpo gorduroso visceral; cml: camada muscular longitudinal; ct: cutícula e dg: tubo digestório. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	50
Figura 27:	Corpo gorduroso da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> . a: localização do corpo gorduroso na larva. b: esquema dos enócitos no corpo gorduroso c,e: enócito isolado do tipo que apresenta vacúolos em seu citoplasma (setas). d,f: enócitos	

- mais comuns na larva que se apresentam em grupo, notar o citoplasma perinuclear (cabeça de seta). g: enócitos pequenos que se encontram em grandes grupos. ct: cutícula e tr: trofócitos. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.....51
- Figura 28: Sistema circulatório da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema circulatório na larva, demonstrando coração e aorta. b: em destaque, região tratada nas micrografias. c: corte longitudinal do coração, observar a região dos óstios (setas). d: corte longitudinal da região da parede do vaso dorsal com a célula formadora do vaso (cabeça de seta). e: corte longitudinal da aorta evidenciando as válvulas (*). f: células pericárdicas associadas à parede da aorta. ao: aorta; he: hemolinfa; lu: lúmen da aorta e re: reto. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.52
- Figura 29: Tegumento da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema tegumentar na larva. b: esquema demonstrando diferentes graus de esclerotização do tegumento. c: corte longitudinal do tegumento da cápsula cefálica, evidenciando o epitélio e a grande quantidade de exocutícula. d: corte longitudinal do tegumento do corpo da larva, verificar a maior quantidade de endocutícula. ed: endocutícula, ep: epiderme e ex: exocutícula. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.....53
- Figura 30: Região dos cecos gástricos da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: região dos cecos gástricos em larvas do controle, demonstrando a existência de grande quantidade de células em cada ceco. d: região dos cecos gástricos em larvas expostas a CL50 de fenantreno por 96h evidenciando a regressão dos cecos (setas). ce: cecos gástricos; es: esôfago e ve: válvula estomodeal. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.57
- Figura 31: Região da válvula estomodeal da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: células de Cuénot em larvas do controle, demonstrando o bordo em escova formado pelas microvilosidades em condição normal. d: células de Cuénot em larvas expostas a CL50 de fenantreno por 96h evidenciando danos na região apical da célula, como o rompimento do bordo em escova (setas). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.58
- Figura 32: Região I do intestino médio da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: região I do intestino médio em larvas do controle, demonstrando a espessura do lúmen do intestino. d: região I do intestino médio em larvas expostas a CL50 de fenantreno por 96h evidenciando o

	estreitamento do lúmen do intestino. ce: cecos gástricos; lu: lúmen do intestino e ve: válvula estomodeal. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	59
Figura 33:	Região III do intestino médio da larva <i>Chironomus sancticaroli</i> . a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c-d: região III do intestino médio em larvas do controle, demonstrando o bordo em escova formado pelas microvilosidades em condição normal. e-f: região III do intestino médio em larvas expostas a CL50 de fenantreno por 96h evidenciando danos na região apical da célula, como o rompimento do bordo em escova (setas). al: alimento e be: bordo em escova. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	60
Figura 34:	Túbulos de Malpighi da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> . a: localização do túbulos de Malpighi na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: túbulos de Malpighi em larvas do controle, demonstrando o bordo em escova formado pelas microvilosidades em condição normal. d: túbulos de Malpighi em larvas expostas a CL50 de fenantreno por 96h evidenciando danos na região apical da célula, diminuição do bordo em escova (seta). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	61
Figura 35:	Corpo gorduroso visceral da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> . a: disposição do corpo gorduroso visceral na larva. b: trofócitos do corpo gorduroso visceral de larvas do controle, evidenciando o núcleo celular (cabeça de seta). c-d: trofócitos do corpo gorduroso visceral de larvas expostas a CL50 de fenantreno por 96h, demonstrando as alterações celulares (setas). e: trofócitos do corpo gorduroso visceral de larvas expostas a CL10 de fenantreno por 8 dias, observar a coalescência vacuolar (setas). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	62
Figura 36:	Glândula salivar da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> . a: localização da glândula salivar na larva. b: esquema da morfologia da glândula. c: corte longitudinal da glândula em larvas do controle, evidenciando o citoplasma homogêneo. d: corte longitudinal da glândula em uma larva exposta a CL50 de fenantreno por 96h, demonstrando a vacuolização do citoplasma (setas). ci: citoplasma homogêneo; nu: núcleo celular e se: secreção. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.	63
Figura 37:	Boxplots das concentrações de fenantreno pelo tamanho do corpo, demonstrando as medidas de tendência central e dispersão, letras diferentes indicam diferenças significativas com $p < 0.001$ (ANOVA-um fator seguido de teste de Tukey a posteriori).	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Medidas de tendência central e dispersão do tamanho da antena em cada ínstar de <i>Chironomus sancticaroli</i> segundo Richardi et al, (2012).	21
Tabela 2:	Valores da Concentração Letal (CL50 – 96h, g.L-1) do Cloreto de Potássio (KCl) e dos intervalos de confiança (IC – 95%) de cada teste de sensibilidade com <i>Chironomus sancticaroli</i>	22
Tabela 3:	Análise granulométrica do sedimento utilizado no cultivo e bioensaios de <i>Chironomus sancticaroli</i>	23
Tabela 4:	Composição química do sedimento utilizado no cultivo e bioensaios com <i>Chironomus sancticaroli</i>	23
Tabela 5:	Alterações histológicas observadas em larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> expostas ao hidrocarboneto fenantreno por 96h nos bioensaios de toxicidade aguda nas concentrações CENO, CL2, CL10, CL30 E CL50.	55
Tabela 6:	Alterações histológicas observadas em larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> expostas ao hidrocarboneto fenantreno por 8 dias nos bioensaios de toxicidade crônica nas concentrações CENO, CL2 E CL10.	56
Tabela 7:	Medidas de tendência central e dispersão do corpo da larva de <i>Chironomus sancticaroli</i> expostas ao hidrocarboneto fenantreno por 8 dias.	64
Tabela 8:	Número de larvas observadas em cada ínstar e sua porcentagem nas três concentrações de fenantreno e controle.	65
Tabela 9:	Medidas absolutas do corpo e antenas de larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> expostas ao hidrocarboneto	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL	3
2.1 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Ecotoxicologia	4
3.2 Macroinvertebrados bentônicos	4
3.2.1 Família Chironomidae	5
3.2.1.1 Espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> Strixino & Strixino, 1981	5
3.3 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	7
3.3.1 Fenantreno	8
3.4 Respostas biológicas relacionadas à contaminação ambiental	9
3.4.1 Biomarcadores histológicos	10
3.4.2 <i>Endpoint</i> crescimento larval	11
3.5 Chironomidae e a ecotoxicologia	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Análise química e mineralógica do sedimento da criação e bioensaios	13
4.1.1 Granulometria	13
4.1.2 Análise química	13
4.1.3 Análise mineralógica	14
4.2 Manutenção da colônia	14
4.3 Material biológico para estudo do padrão histológico	15
4.4 Análise morfológica por microscopia óptica	16
4.5 Teste de sensibilidade ao KCl	17
4.6 Bioensaios de toxicidade	18
4.6.1 Bioensaios de toxicidade aguda	18

4.6.2 Bioensaios de toxicidade crônica.....	20
4.6.2.1 <i>Endpoint</i> crescimento larval.....	21
5. RESULTADOS	21
5.1 Teste de sensibilidade	21
5.2 Análise do sedimento.....	22
5.3 Descrição histológica	24
5.3.1 Sistema Digestório.....	24
5.3.1.1 Estomodeu ou intestino anterior	25
5.3.1.2 Mesêntero ou intestino médio.....	25
5.3.1.3 Proctodeu ou intestino posterior	26
5.3.2 Glândula salivar	27
5.3.3 Sistema Excretor.....	27
5.3.3.1 Túbulos de Malpighi.....	27
5.3.3.2 Células pericárdicas	28
5.3.4 Sistema Nervoso.....	28
5.3.4.1 Cérebro.....	28
5.3.4.2 Cadeia nervosa ventral.....	29
5.3.5 Sistema endócrino ou complexo retrocerebral.....	29
5.3.5.1 <i>Corpora allata</i>	29
5.3.5.2 Glândulas protorácicas	29
5.3.5.3 Glândulas póscerebrais anteriores	30
5.3.5.4 <i>Corpora cardiaca</i>	30
5.3.6 Corpo gorduroso	30
5.3.6.1 Trofócitos.....	30
5.3.6.2 Enócitos.....	31
5.3.7 Sistema circulatório.....	31
5.3.7.1 Coração	31

5.3.7.2 Aorta	32
5.3.8 Tegumento.....	32
5.3.8.1 Cápsula cefálica	32
5.3.8.2 Corpo.....	33
5.4 Exposição ao fenantreno	54
5.4.1 Bioensaios de toxicidade aguda	54
5.4.2 Bioensaios de toxicidade crônica.....	55
5.4.2.1 Histologia.....	55
5.4.2.2 Crescimento larval	64
6. DISCUSSÃO	67
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
REFERÊNCIAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

As substâncias tóxicas ocorrem naturalmente no ambiente e sua distribuição deveria ser constante devido principalmente aos processos biológicos naturais, que causam tanto a degradação quanto a sua síntese (Wood, 1974). Porém, o crescente aumento da industrialização e urbanização acarreta na liberação de efluentes e resíduos tóxicos que conseqüentemente geram desequilíbrios dessas quantidades no ambiente levando a poluição que atinge principalmente os solos e os corpos d'água por lixiviação, lavagem da vegetação e escoamento superficial de águas pluviais (Sanseverino & Nessimian, 2008).

Entre a grande quantidade de substâncias liberadas nos ecossistemas aquáticos, estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que foram considerados pela United States Environmental Protection Agency - USEPA (2008) como poluentes prioritários devido à sua toxicidade, persistência e predominância no meio ambiente.

No ambiente aquático o sedimento atua como local de armazenamento e conseqüentemente liberação de substâncias orgânicas e inorgânicas, como as misturas de metais encontradas em concentrações muito baixas (traço) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos introduzidos por processos geoquímicos naturais ou por atividade antropogênica (Pery *et al.*, 2008).

Devido a este cenário, é necessário o controle e o monitoramento da qualidade dos corpos hídricos e seus compartimentos, bem como, avaliar os efeitos causados pelas substâncias, que foram detectadas por técnicas analíticas, na biota presente nesses ecossistemas (Cairns & Pratt, 1993). Para ampliar a eficiência dos sistemas de detecção de impactos ambientais é fundamental a integração de resultados analíticos com características biológicas dos ecossistemas (Rosenberg & Resh, 1993, Buss *et al.*, 2003).

No sedimento ocorrem imaturos de Chironomidae, insetos considerados os mais abundantes e com maior distribuição nos corpos hídricos (Trivinho-Strixino, 2011). Suas larvas possuem hemoglobina em sua hemolinfa, o que confere tolerância a baixas concentrações de oxigênio na água (Trivinho-Strixino, 2011) além de parecer atuar no metabolismo de xenobióticos (Weber & Vinogradov, 2001; Ha & Choi, 2008), tornando possível a estes insetos se manterem por maior tempo em ambientes degradados apresentando efeitos crônicos que podem ser

avaliados através de biomarcadores de contaminação ambiental. Em consequência destas características, estes organismos são considerados biondicadores de qualidade de sedimentos.

Os biomarcadores e *endpoints* são respostas que os organismos apresentam frente a uma condição adversa desde o nível molecular até o nível do indivíduo (Amorim, 2003). Para Chironomidae existem diversos estudos aplicando biomarcadores moleculares e bioquímicos (Callaghan *et. al*, 2000; Callaghan *et. al*, 2002; Crane *et. al*, 2002; Lee *et. al*, 2006, Printes *et al*, 2007) e a nível de indivíduo (Péry *et. al*, 2003; Lee & Choi, 2007 e Azevedo-Pereira, 2010), porém existe uma lacuna no conhecimento na aplicação de biomarcadores celulares e teciduais nesse grupo. Em estudos ecotoxicológicos indica-se que na utilização de biomarcadores de baixo nível de organização biológica sejam aplicados também *endpoints* de níveis organizacionais mais altos, para que seja realizada uma associação se aquela alteração no biomarcador, a longo prazo, irá refletir em efeito no organismo, possuindo relevância ecológica.

A ferramenta histologia pode elucidar efeitos em células e tecidos, além de auxiliar na compreensão da fisiologia de órgãos e sistemas. Esta técnica é amplamente utilizada para peixes na ecotoxicologia aquática (Bernet *et al*, 1999), sendo uma ferramenta sensível para a detecção de efeitos sutis de poluentes, elucidação dos órgãos-alvo e possíveis mecanismos tóxicos. Além da lacuna existente na utilização dessa ferramenta nestes insetos, tornam-se necessários também mais estudos sobre a histologia de Chironomidae.

Como não existem descrições recentes da histologia do grupo e principalmente das espécies utilizadas em testes de toxicidade, a descrição dos possíveis órgãos e células alvo torna-se relevante. Além disso, após a preocupação da USEPA - *United States Environmental Protection Agency* (1994) em verificar a qualidade dos sedimentos, utilizando estes organismos em testes de toxicidade, torna-se importante resgatar a histologia de Chironomidae como um possível biomarcador de contaminação ambiental.

2. OBJETIVO GERAL

Descrever a histologia da larva de *Chironomus sancticaroli* e avaliar alterações na estrutura histológica e no desenvolvimento causadas pela exposição aguda e crônica ao hidrocarboneto fenantreno

2.1 Objetivos específicos

- Realizar um estudo morfofuncional de possíveis órgãos alvo de alterações em larvas de *Chironomus sancticaroli*;
- Avaliar os efeitos histopatológicos em larvas expostas ao hidrocarboneto fenantreno, em bioensaios de toxicidade aguda e crônica;
- Verificar os efeitos no desenvolvimento do estágio larval devido à exposição crônica ao fenantreno.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ecotoxicologia

A ecotoxicologia é a caracterização, entendimento e prognóstico dos efeitos deletérios de produtos químicos ou misturas de substâncias de origem antropogênica nos seres vivos. Assim, esta ciência estuda os efeitos tóxicos de substâncias químicas e efluentes industriais em uma população, na comunidade e também no ecossistema, bem como as medidas necessárias para prever, conter ou tratar os danos causados (Guaratini *et al.*, 2008). Suas aplicações potencialmente mais interessantes ocorrem na detecção de impactos em que os organismos sofreram, demonstrando a história daquele ambiente. Esta ciência integra os conceitos da Ecologia, em relação à diversidade e representatividade dos organismos e seu papel ecológico nos ecossistemas, e da Toxicologia, avaliando os efeitos adversos dos poluentes sobre as comunidades biológicas (Zagatto, 2008).

3.2 Macroinvertebrados bentônicos

Os macroinvertebrados bentônicos são organismos que habitam a região bentônica dos ecossistemas aquáticos, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, sendo em sua maioria insetos (Rosenberg & Resh, 1993).

Os organismos que compõem os zoobentos estão em contato direto com o sedimento, utilizando-o para proteção e no forrageamento. A distribuição e a composição da taxocenose desses organismos são influenciadas por fatores bióticos e abióticos, tais como: vento, a concentração de oxigênio; a disponibilidade e a qualidade do alimento, o tipo do substrato, a temperatura do meio, além de adaptações fisiológicas das espécies para diferentes condições ambientais e a competição intra e inter específica (Esteves, 1988).

3.2.1 Família Chironomidae

Dentre os insetos aquáticos que compõem a fauna bêntica, estão os organismos da família Chironomidae que são considerados cosmopolitas (Saether & Ekrem, 2003), sendo suas formas imaturas as mais abundantes nos ecossistemas aquáticos. Desempenham importante papel na ciclagem de nutrientes e na estruturação da cadeia trófica, sendo utilizados como item alimentar por diversos grupos de predadores aquáticos (Trivinho-Strixino, 2011). A fase adulta tem vida curta, desempenhando o papel de dispersão e reprodução da espécie (Frouz, 1997).

São encontrados em uma grande faixa de habitats, onde estão sujeitos a diferentes condições ambientais. As larvas de Chironomidae possuem grande potencial de adaptação aos diferentes ambientes, por isso algumas espécies podem ser encontradas em locais considerados inóspitos para a maioria dos insetos, como em geleiras polares, nascentes termais, lagos profundos, corpos de água temporários, águas salobras e marinhas (Jonusaite *et al.*, 2011). O gênero *Chironomus* é considerado um invasor especializado, devido à sua grande plasticidade fisiológica (McLachlan, 2012), possibilitando a utilização de uma ampla variedade de ambientes em águas interiores.

O oxigênio é o fator que mais influencia a distribuição e o desenvolvimento das larvas de Chironomidae (Vallenduuk & Pillot, 2007) e a subfamília Chironominae é qualitativamente e quantitativamente dominante em locais com baixa concentração de oxigênio, em consequência da presença de hemoglobina na hemolinfa (Pillot, 2009). Assim, devido a sua relevância ecológica no fluxo energético e plasticidade fisiológica, estes organismos são considerados bioindicadores de qualidade de sedimentos límnicos.

3.2.1.1 Espécie *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981

Chironomus sancticaroli, foi descrita por Strixino & Strixino em 1981, a partir de exemplares encontrados na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, tendo registros para espécie somente para o Brasil. São insetos holometábolos, portanto, apresentam ciclo de vida completo: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1), sendo que

as três primeiras fases do ciclo de vida são aquáticas e os adultos são terrestres (Strixino & Strixino, 1981). Os adultos não se alimentam e possuem tempo de vida efêmero de aproximadamente quatro dias, portanto, esta fase do ciclo de vida é direcionada a reprodução e dispersão (Strixino & Strixino, 1981).

Possuem de dezesseis a dezoito gerações por ano (Strixino & Trivinho-Strixino, 1985), esta amplitude ocorre devido à variação de temperatura, pois diferenças de 5° C fazem o tempo do ciclo de vida dobrar, portanto, no período do ano com condições térmicas favoráveis, ocorrem picos de emergência bastante próximos entre si, ocasionando curtas explosões populacionais (Trivinho-Strixino & Strixino, 1982).

Chironomus sancticaroli considerada por muito tempo sinonímia de *Chironomus xanthus* (Trivinho-Strixino, 2011b), é de fácil cultivo em laboratório (Fonseca & Rocha, 2004) sendo utilizada em ensaios ecotoxicológicos para avaliação da qualidade ambiental (Fonseca, 1997; Dornfeld, 2002; Bramorski, 2004; Silva, 2005; Dornfeld, 2006; Costa, 2007; Barbosa, 2008; Pusceddu, 2009; Sales, 2009; Bonani, 2010 e Viveiros, 2012).

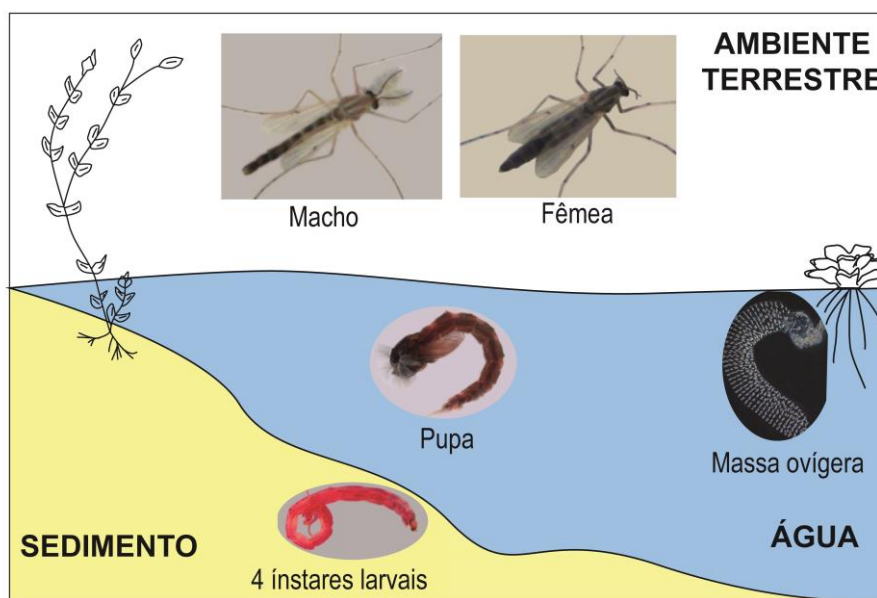


Figura 1: Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli*

3.3 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são considerados poluentes prioritários por diversos órgãos ambientais, sendo precursores de ações mutagênicas e tumorais em sistemas biológicos (WHO, 1983).

HPAs são compostos aromáticos, ou seja, que possuem dois ou mais anéis benzênicos em sua constituição, formados exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio, organizados sob forma linear, angular ou agrupada (Netto *et al.*, 2000). São formados pela combustão incompleta da matéria orgânica, que é influenciada principalmente por condições de temperatura e pressão que irão interferir no perfil constituinte destes compostos (Page *et al.*, 1999).

Os incêndios florestais e a queima de combustíveis fósseis são as principais fontes emissoras de HPAs no meio ambiente, porém a indústria metalúrgica, exaustão de incineradores de rejeito e resíduos sólidos industriais são as fontes que liberam maior quantidade, além da liberação em acidentes ambientais desses produtos em corpos hídricos. Assim todas essas atividades contribuem consideravelmente para o aumento das concentrações de HPAs no meio ambiente (Meire *et al.*, 2007).

Existem dezesseis hidrocarbonetos policíclicos considerados importantes no monitoramento ambiental (USEPA, 1983). Esses poluentes são transportados no meio ambiente, principalmente, por via atmosférica associado ao material particulado fino, o que permite uma ampla distribuição desses compostos no ambiente. Na sequência podem ser depositados sob a forma seca (vapor ou particulada) ou úmida (precipitação sob a forma dissolvida ou particulada) sobre sistemas aquáticos e terrestres (Garban *et al.*, 2002; Rose & Rippey 2002).

A adsorção desses compostos entre água e ar, entre água e sedimento e entre água e a biota são características importantes na distribuição de HPAs no ambiente. Como apresentam alto coeficiente de partição entre solventes orgânicos e água, torna-se possível prever possíveis taxas de acumulação em compartimentos como sedimentos e solos (ricos em matéria orgânica adsorvida), assim como na bioacumulação em sistemas biológicos (Neff 1984; Meire *et al.*, 2007).

Os principais processos que contribuem para a degradação dos HPAs na água são a foto oxidação, oxidação química e a biodegradação por

microorganismos aquáticos (Neff, 1979). A contribuição de cada um desses processos para a degradação dos hidrocarbonetos irá depender da temperatura, profundidade, o estado de poluição, taxa de fluxo e a quantidade de oxigênio dissolvido na água (ATSDR, 1995). O processo de biotransformação dos HPAs é crucial na ativação e formação de possíveis agentes carcinogênicos (Hall *et al.*, 1989).

3.3.1 Fenantreno

Dentre os dezesseis hidrocarbonetos considerados importantes no monitoramento ambiental pela USEPA, está o fenantreno sendo este polinuclear, cristalino, e isômero do antraceno. Pertence à classe dos compostos orgânicos semi-voláteis, formados por três anéis benzênicos ligados de forma linear, angular ou agrupados, contendo apenas carbono e hidrogênio (Verschueren, 2001) (Figura 2).

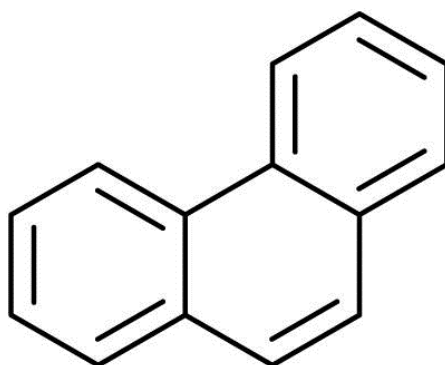


Figura 2: Estrutura química do hidrocarboneto fenantreno.

É considerado um poluente prioritário devido à sua toxicidade, persistência e predominância no meio ambiente (US EPA, 2008). Moody *et al.* (2001) afirmam que o fenantreno não oferece risco ao homem como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de maior peso molecular, porém é altamente tóxico à organismos aquáticos.

Este composto é utilizado industrialmente para a produção de corantes e explosivos, também é conhecido como fenantrin, com massa molecular de 178,2 g

e solubilidade em água de 1,29 mg/L (Verschueren, 2001). Para águas subterrâneas, os limites de contaminação são de 0,02 µg/L para referência; 2,5 µg/L para alerta e 5,0 µg/L para intervenção (CETESB, 2005).

Nos animais, a biotransformação deste composto e de outros HPAs é realizada pelo sistema das monoxigenases. A detoxificação é um processo complexo, que antes da formação de compostos não-tóxicos e produtos finais inofensivos, é realizada por reações enzimáticas e não-enzimáticas, sendo os HPAs convertidos em óxidos de areno, seguida pela formação de derivados de trans-dihidrodióis, fenóis e quinonas. Esses produtos intermediários são conhecidos como tóxicos e/ou mutagênicos e são transformados em produtos menos tóxicos por várias reações enzimáticas e não enzimáticas (Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999).

3.4 Respostas biológicas relacionadas à contaminação ambiental

A simples detecção da presença de substâncias químicas nos ecossistemas por si só não indica efeitos prejudiciais. Conexões devem ser estabelecidas entre os níveis externos de exposição, níveis internos de contaminação dos tecidos e efeitos adversos prévios (Van der Oost *et al.*, 2003).

Vários são os parâmetros biológicos que podem sofrer alteração como consequência da interação entre o agente químico e o organismo, porém a determinação quantitativa destes parâmetros usados como indicadores biológicos ou biomarcadores só é possível se existir correlação com a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico da substância. Biomarcadores são quaisquer alterações precoces determinadas no organismo que avalie a intensidade da exposição e o risco a saúde animal (Amorim, 2003). A sua utilização é baseada na suposição de que baixas concentrações de substâncias tóxicas irão causar respostas celulares no organismo antes que efeitos prejudiciais sejam observados nos níveis mais altos de organização biológica (populações e ecossistemas) (Domingues *et al.*, 2010).

Os biomarcadores podem ser classificados em três tipos (WHO, 1993):

Biomarcadores de Exposição: confirmam e avaliam a exposição individual ou grupo, à uma substância particular, correlacionando a exposição externa e a quantificação da exposição interna.

Biomarcadores de Efeito: documentam as alterações ou efeitos adversos no organismo decorrentes da exposição a absorção da substância química, exposição e efeito, elucida a definição da relação dose-resposta.

Biomarcadores de Susceptibilidade: permitem elucidar o grau de respostas da exposição provocada nos indivíduos.

Endpoints são mudanças no comportamento, sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos, ou seja, alterações em níveis de organização biológica superiores (Forbes *et al.*, 2006).

Para organismos aquáticos uma série de biomarcadores e *endpoints* podem ser aplicados frente à exposição à xenobióticos para a obtenção de respostas genéticas, bioquímicas e/ou histológicas (Benincá *et al.*, 2012) e níveis superiores de organização biológica como comportamento e crescimento (Azevedo-Pereira & Soares, 2010)

3.4.1 Biomarcadores histológicos

A histopatologia é uma ferramenta que pode avaliar os efeitos da exposição prévia ou atual a um tipo de estresse no indivíduo, que representa o nível intermediário da organização biológica (Myers & Fournie, 2002).

A vantagem da utilização da histopatologia como biomarcador está na sua relação com o nível de organização biológica, pois as mudanças histológicas aparecem em médio prazo para estressores subletais e fornece método rápido para detectar o efeito de contaminantes, especialmente em exposição crônica em vários tecidos e órgãos. Amplamente utilizada na ecotoxicologia aquática, principalmente em peixes (Bernet *et al.*, 1999), na avaliação de órgãos como brânquias, fígado, rins e gônadas. A capacidade qualitativa ou quantitativa de determinar alterações celulares antes da morte do organismo geralmente fornecem os primeiros indícios de toxicidade e permite possíveis inferências sobre os mecanismos tóxicos. Portanto, dados sobre alterações celulares e histológicas podem ser utilizados como biomarcadores de exposição à contaminantes

ambientais, em estudos de campo e sob condições de laboratório (Fent & Meier, 1994).

O crescente número de estudos utilizando biomarcadores histológicos está relacionado com o fato de eles permitirem avaliar a saúde dos peixes mais realisticamente que biomarcadores bioquímicos e assim, os resultados podem ser extrapolados em nível de comunidade e ecossistema (Costa *et al.*, 2009).

Para os organismos da família Chironomidae existem apenas dois trabalhos demonstrando histopatologia no intestino médio de larvas expostas ao ácido tânico e *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Rey *et al.*, 1998 e Rey *et al.*, 1999).

3.4.2 Endpoint crescimento larval

O efeito no crescimento larval é um *endpoint* já utilizado em vários estudos com larvas de Chironomidae (Nebeker *et al.*, 1984; Ankley *et al.*, 1994 e Azevedo-Pereira & Soares, 2010). Porém, Sibley *et al.* (1997) questionou se esse parâmetro realmente apresentava relevância ecológica, e verificou uma correlação positiva entre o crescimento, efeitos reprodutivos e estrutura populacional de Chironomidae a longo prazo. A redução do crescimento dessas larvas foi associada com um declínio proporcional no investimento reprodutivo das fêmeas adultas, levando a uma diminuição do número de larvas que eclodem, reduzindo ao longo de gerações, o tamanho das populações.

3.5 Chironomidae e a ecotoxicologia

O sedimento foi considerado pela USEPA (2005) um ambiente de trocas e interações de compostos químicos com a coluna d'água e a biota residente, podendo afetar todo o ecossistema. Devido a estas características, em 1994, este órgão lançou um guia de avaliação de toxicidade aguda de sedimentos utilizando organismos marinhos, e de água doce incluindo *Chironomus tentans* (Fabricius, 1805) (Diptera: Chironomidae), tendo a preocupação com o desenvolvimento de metodologias padronizadas para organismos associados ao sedimento (Adams & Rowland, 2003).

Organismos da família Chironomidae têm sido utilizados, como bioindicadores e como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos com sedimentos, em vários estudos científicos, além de testes de toxicidade em organizações ambientais (Di Veroli *et al.*, 2012a). A maioria dos trabalhos que utiliza estes organismos realizam ensaios ecotoxicológicos em laboratório com substâncias isoladas, aplicando biomarcadores bioquímicos e genéticos (Callaghan *et al.*, 2000; Callaghan *et al.*, 2002; Crane *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006, Printes *et al.*, 2007), ou *endpoints* como taxa de sobrevivência, crescimento, comportamento e emergência de adultos (Péry *et al.*, 2003; Lee & Choi, 2007 e Azevedo-Pereira, 2010). Enquanto trabalhos de campo se restringem à coletas e análise de deformidades morfológicas no mento (estrutura do aparelho bucal das larvas) (Servia *et al.*, 2004, Di Veroli *et al.*, 2012b e Odume *et al.*, 2012) ou exposição em laboratório de organismos de cultivo à amostras de sedimentos ambientais contaminados, avaliando *endpoints* como desenvolvimento, mortalidade e deformidades morfológicas (Di Veroli *et al.*, 2012a).

Para a espécie *C. sancticarioli*, utilizando biomarcadores existem apenas dois trabalhos (Printes *et al.*, 2007 e Printes *et al.*, 2011) que avaliaram a atividade das enzimas AChE (Acetilcolinesterase) e GST (Glutathione S-transferase) em exposição a substâncias isoladas e amostras ambientais de um riacho. Diante deste cenário, existe a necessidade de estudos histopatológicos que possam elucidar órgãos alvo utilizando imaturos de Chironomidae.

Uma revisão bibliográfica realizada por Krull & Barros (2012) sobre a ecotoxicologia no Brasil demonstrou que 29,2% e 22,1% dos estudos são realizados com peixes e cladóceros, respectivamente, sendo os insetos, grupo mais diverso entre os animais, não citado no trabalho pela escassez de estudos no país. Além disso, 83,4% são realizados avaliando a toxicidade da água enquanto 6,9 % utilizam organismos relacionados ao sedimento. Os biomarcadores histológicos são utilizados em 6% dos estudos, demonstrando a importância de pesquisas utilizando esse parâmetro. E em 21% dos casos, a escolha do organismo modelo leva em consideração se a espécie é nativa e em última instância, com 3%, a abundância ou representatividade do organismo no meio ambiente.

Dentro deste contexto, colocamos a necessidade de dar maior importância a organismos que habitam sedimento e também a Chironomidae, pois seus

representantes mostram-se com grande relevância e abundância no meio ambiente além de tornar possível a utilização de biomarcadores histológicos no grupo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análise química e mineralógica do sedimento da criação e bioensaio

O sedimento, utilizado na criação e nos bioensaios, foi analisado no Laboratório de Análises de Minerais e Rochas (LAMIR/UFPR) quanto a inexistências de compostos tóxicos que pudessem causar toxicidades às larvas.

4.1.1 Granulometria

Para determinar a granulometria da amostra de sedimento foi realizado um peneiramento a úmido, utilizando um conjunto de sete peneiras Bertel® que foram pesadas secas individualmente (com malhas de 2,36; 1,18; 0,35; 0,18; 0,09; 0,06; 0,04 mm). Posteriormente 200 g da amostra de sedimento foram submetidos ao conjunto empilhado de peneiras, organizadas em ordem decrescente de malha, sendo adicionado ao material um jato de água, com o propósito de facilitar a passagem das partículas de sedimento através da malha de peneiramento.

Em seguida o conjunto de peneiras permaneceu na estufa por 24 horas e o material retido em cada peneira foi pesado, e a diferença entre o peso inicial e o peso final foi calculada para verificar a predominância dos tamanhos de partículas e a faixa granulométrica.

4.1.2 Análise química

A análise química foi realizada através da Fluorescência de Raio X (FRX). A amostra de sedimento foi aleatorizada e em seguida pulverizada em uma panela de carbeto de tungstênio. Em seguida, 7 g da amostra juntamente com 1,4 g de cera orgânica/aglomerante foram homogeneizados manualmente e prensados por 2

minutos e 20 segundos em uma prensa (40 toneladas/cm²), para confeccionar uma pastilha que foi encaminhada ao espectrômetro que determinou a composição química do sedimento. O equipamento usado foi o espectrômetro de raios X Phillips PW 2400.

Adicionalmente, 2 g de amostra foram usados para a determinação da perda ao fogo, pois os elementos leves não são detectados no FRX e a perda ao fogo supre essa falta. Antes da determinação da perda ao fogo a amostra em pó foi seca a 100 °C por 8 horas. No experimento de perda ao fogo, a amostra seca foi pesada com exatidão (M1 = massa do cadinho mais amostra), dentro de um cadinho de porcelana (Mc = massa do cadinho vazio) e é aquecida a 1000 °C por três horas e, após resfriado à temperatura ambiente, o cadinho com a amostra calcinada é pesado (M2 = massa do cadinho mais amostra calcinada). A perda ao fogo, percentual, é calculada a partir da relação $100 \times [(M1-M2)/(Mc-M1)]$. A interpretação da análise foi realizada no software Super Q.

4.1.3 Análise mineralógica

A análise mineralógica foi realizada através de uma Difração de Raio X. A amostra de sedimento pulverizada (em pó) foi colocada em uma placa de difração e prensada manualmente, sendo posteriormente encaminhada ao Difratorômetro de Raio X, obtendo-se um difratograma pelo programa DataColector (Pananalytical, Empyrean). Para a interpretação do resultado foi utilizado o programa Xpert High Score (Pananalytical) com o banco de dados PDF2.

4.2 Manutenção da colônia

Os organismos da espécie *Chironomus sancticaroli* utilizados foram provenientes de uma colônia matriz mantida em sala de criação do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) desde fevereiro de 2008, com condições controladas de temperatura (25 ± 2°C), umidade (80 ± 10%) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro). O cultivo é mantido em bandejas e aquários com aeração constante.

A criação da espécie foi adaptada de Maier *et al.* (1990). Os organismos são mantidos em cinco aquários de vidro, com as seguintes dimensões; um aquário de 60 cm x 40 cm x 35 cm; com capacidade para 85 L (Figura 3a) e quatro aquários de 25 cm x 15 cm x 25 cm; com capacidade para 10 L (Figura 3b). Em todos os aquários foi utilizado areia como sedimento e água desclorada sendo no aquário maior 3 cm de sedimento e 50 litros de água e nos aquários menores 1 cm de sedimento e 7 litros de água, com aeração constante.

Semanalmente foi adicionado ração DogChow® triturada sendo 10g para o aquário maior e 2,86 g para os aquários menores, e mensalmente foi realizada a troca parcial da água e a limpeza dos aquários, em semanas intercaladas para sempre possuir aquários com organismos em fase reprodutiva.

Estes aquários foram cobertos com uma tela de tecido para que não ocorra o escape dos adultos que emergem, mas permitindo que haja espaço suficiente para cópula e oviposição.

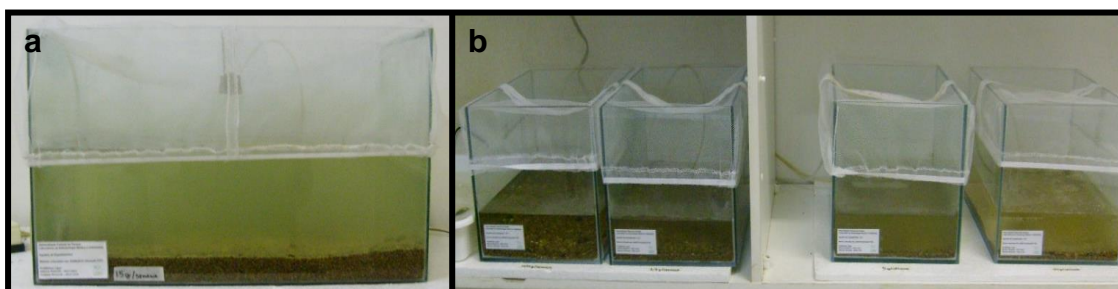


Figura 3: Aquários utilizados para a criação da espécie *Chironomus sancticaroli* em sala de criação com condições controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($80 \pm 10\%$) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro). a: aquário 85L e b: aquário 10L.

4.3 Material biológico para estudo do padrão histológico

Massas ovíferas foram retiradas da colônia matriz e individualizadas em bandejas de plástico (dimensões: 38 cm x 24 cm x 8 cm ; com capacidade para 7 L) (Figura 4), contendo 0,4g de ração triturada TetraMin®, 4 litros de água desclorada e aeração constante, foram utilizadas 30 larvas de III instar final / IV instar inicial (7 dias) para descrição histológica do estágio larval.

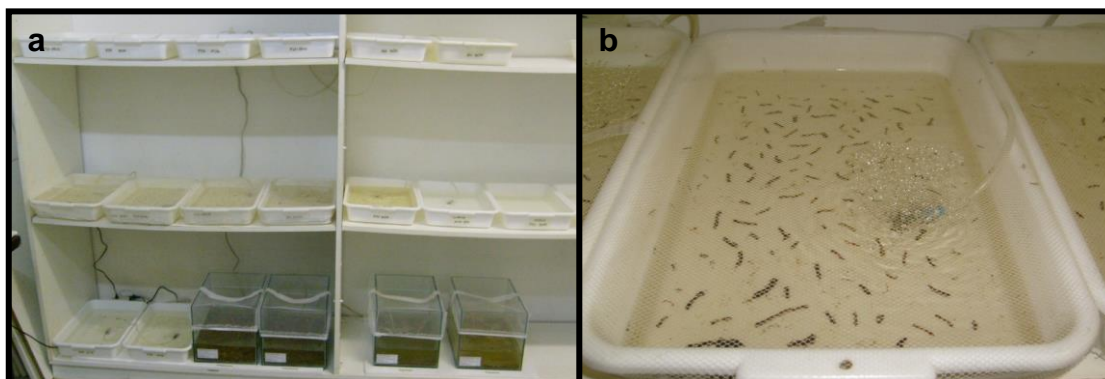


Figura 4: Sala de criação com imagens das bandejas utilizadas para a separação das larvas de *Chironomus sancticaroli* para estudo do padrão histológico e realização dos bioensaios. a: aspecto geral da disposição das bandejas na sala e b: detalhe da bandeja contendo larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial e aeração constante.

4.4 Análise morfológica por microscopia óptica

As larvas foram fixadas integras, ou seja, sem nenhuma incisão em solução Duboscq para insetos (ácido pícrico 1g + formaldeído 60ml + ácido acético glacial 15ml + 150 ml de álcool etílico p.a. a 80%), por 4 horas em estufa a 56 °C para permitir a absorção do fixador de acordo com Círio (2005). Após a fixação as larvas passaram por três banhos em álcool 70% de 30 minutos para remoção da solução fixadora, e desidratadas em uma série alcoólica crescente (70% a 100%) permanecendo 45 minutos em cada concentração. Em seguida as larvas foram diafanizadas em xilol por 10 minutos e então transferidas para parafina de embebição (*overnight*) e incluídas em parafina histológica.

Foram obtidas secções transversais, longitudinais laterais e dorsoventrais de 7 µm de espessura e então distendidas em banho maria, colocadas em lâminas de microscopia e sob os cortes foi aplicado albumina de Meyer para colagem na lâmina, e secas a temperatura ambiente. Todos os cortes obtidos de todas as larvas foram utilizados. Posteriormente as secções foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). Após a montagem das lâminas com Permount® as secções histológicas foram analisadas e documentadas em fotomicroscópio óptico. Adicionalmente foram realizadas dissecções de algumas larvas para compreensão da morfologia interna, e ilustrações de órgãos e estruturas foram realizadas com a utilização do programa Adobe Illustrator CS5, e as pranchas e edições das imagens capturadas no fotomicroscópio foram realizadas no Adobe Photoshop

CS5. A terminologia histológica utilizada foi a descrita por Junqueira & Carneiro (2004).

4.5 Teste de sensibilidade ao KCl

Testes de toxicidade com uma substância referência são aplicados com o objetivo de obter três informações relevantes: o estado de saúde dos organismos usados nos testes; verificar as condições de reprodutibilidade e sensibilidade dos procedimentos do bioensaio e se a sensibilidade de uma determinada população em uso no laboratório é comparável a outras populações de outros laboratórios (USEPA, 2000).

A substância de referência Cloreto de Potássio (KCl) é comumente utilizada para outras espécies de Chironomidae já padronizadas como organismo-teste por órgãos de defesa ambiental, como por exemplo *Chironomus tentans* (USEPA, 2000).

Foram realizados dezesseis testes de sensibilidade, os quais consistiram em expor os organismos-teste a diferentes concentrações da substância de referência KCl de acordo com o protocolo descrito por Dornfeld (2006). Os testes tiveram duração de 96 horas e os resultados foram analisados utilizando o programa Trimmed Spearman-Kärber, com a finalidade de se obter a CL_{50} para o cloreto de potássio.

As concentrações de KCl utilizadas foram 1,5; 2,25; 3,5; 5,0; 7,5 g/L além de um controle contendo apenas água. Para a realização desses testes foi utilizado 200 ml da solução de KCl, 0,024g de ração TetraMin® apenas no primeiro dia de ensaio e seis organismos em cada uma das três réplicas realizadas por concentração, totalizando 108 larvas utilizadas por ensaio (Figura 5).

Teste de Sensibilidade da população de <i>Chironomus sancticaroli</i> (KCl)						
Concentrações de Cloreto de Potássio (KCl)						
[C] (g/L)	Controle álcool	1,5	2,25	3,5	5,0	7,5
Réplica 1	6	6	6	6	6	6
Réplica 2	6	6	6	6	6	6
Réplica 3	6	6	6	6	6	6

Figura 5: Representação esquemática dos testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de potássio (KCl) em larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial para avaliar a qualidade da população de *Chironomus sancticaroli* mantida em laboratório. Foram utilizadas cinco concentrações além do controle com água, cada tratamento apresentou três réplicas, cada uma contendo seis larvas da espécie.

Para o estabelecimento da faixa de sensibilidade foi utilizado o modelo proposto pela USEPA (2000), o qual consiste na utilização dos valores médios da CL_{50} obtidos, mais ou menos duas vezes o desvio padrão. Neste modelo, calcula-se a média (X), o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV). Com estes dados estabelece-se o limite superior ($X + 2.DP$) e o inferior ($X - 2.DP$). Portanto, os valores da CL_{50} compreendidos dentro desta faixa são aproveitados, e consequentemente os que estiverem fora serão descartados.

4.6 Bioensaios de toxicidade

As larvas utilizadas nos bioensaios foram submetidas ao hidrocarboneto fenantreno com 97% de pureza da marca Sigma-Aldrich®, frasco de 25 g, REF. 77470, envase: 23207048, lote: 1290376, fabricação em 07/08/2007 e vencimento em 01/02/2016.

4.6.1 Bioensaios de toxicidade aguda

As calibrações da faixa letal do fenantreno em larvas de *C. sancticaroli* foram realizadas por Moraes (2011) no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária,

e as concentrações letais foram estimadas utilizando os dados de mortalidade no programa Probit Basic, sendo estas as concentrações que causam mortalidade de 0 a 99% dos organismos-teste. Os bioensaios de toxicidade aguda do presente trabalho seguiram as mesmas condições estabelecidas por Moraes (2011).

Os bioensaios foram realizados em frascos de vidro com capacidade de 300 ml, nos quais foram adicionados 200 ml da solução-teste. Foram selecionadas cinco concentrações do fenantreno: CENO (0,12 mg/L); CL₂ (0,6 mg/L); CL₁₀ (0,78 mg/L); CL₃₀ (1,01 mg/L) e CL₅₀ (1,2 mg/L) mais o controle contendo apenas álcool absoluto na solução (150µl). A primeira concentração escolhida representa o valor encontrado para a concentração de efeito não observado (CENO (CL₅₀/10)). Foram realizados dois bioensaios estáticos completos com cada concentração contendo quatros réplicas, os quais continham 24g de areia como sedimento e dez larvas de *C. sancticaroli* do III ínstar final/IV ínstar inicial, sendo utilizadas 240 larvas por ensaio (Figura 6). Estes bioensaios foram acondicionados em câmara tipo BOD programadas com a temperatura de 25°C (\pm 2°C) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro), sem aeração e alimento. A temperatura e o pH da água foi monitorado no início e no final do teste e a dureza da água ao final. A duração dos testes foi de 96 horas e a leitura foi realizada em bandejas de plástico, nas quais foi colocado o conteúdo de cada frasco para a triagem dos organismos. Foram retiradas aleatoriamente 10 larvas consideradas vivas de cada concentração, totalizando 60 larvas para estudos histopatológicos, como descrito no item 4.4.

Bioensaios de Toxicidade Aguda (fenantreno)						
Concentrações fenantreno		CENO	CL ₂	CL ₁₀	CL ₃₀	CL ₅₀
ICl (mg/L)	Controle álcool	0.12	0.6	0.78	1.01	1.2
Réplica 1	10	10	10	10	10	10
Réplica 2	10	10	10	10	10	10
Réplica 3	10	10	10	10	10	10
Réplica 4	10	10	10	10	10	10

Figura 6: Representação esquemática dos bioensaios de toxicidade aguda com o hidrocarboneto fenantreno em larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial de *Chironomus sancticaroli*.

4.6.2 Bioensaios de toxicidade crônica

Os bioensaios foram realizados em frascos de vidro cobertos com copos plásticos com capacidade de 300 ml, nos quais foram adicionados 200 ml da solução-teste. Foram selecionadas três concentrações do fenantreno: CENO (0,12 mg/L); CL2 (0,6 mg/L); CL10 (0,78 mg/L) mais o controle contendo apenas álcool absoluto na solução (200µl).

Foram realizados dois bioensaios semi-estáticos completos com cada concentração contendo quatro réplicas, os quais continham 24g de areia como sedimento e vinte larvas de *C. sancticaroli* do I ínstar, sendo utilizadas 320 larvas por ensaio (Figura 7). Estes bioensaios foram acondicionados em câmara tipo BOD programada com a temperatura de 25°C (\pm 2°C) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro) com 4 ml de suspensão aquosa da ração TetraMin® (1g/200 ml de água destilada), com aeração constante, a temperatura e o pH da água foi monitorado no início e no final do teste e a dureza da água no final. A duração dos testes foi de 8 dias (período necessário para as larvas do controle alcançarem o IV ínstar larval), e a cada 48 horas foi realizada a troca da água, pois este seria a meia vida do fenantreno na água e adicionada 4 ml de solução de ração; a leitura foi realizada em bandejas de plástico, nas quais foi colocado o conteúdo de cada frasco para a triagem dos organismos. Foram retiradas aleatoriamente 10 larvas consideradas vivas de cada concentração, totalizando 40 larvas que com estas foram realizados os estudos histopatológicos, com o descrito no item 4.4.

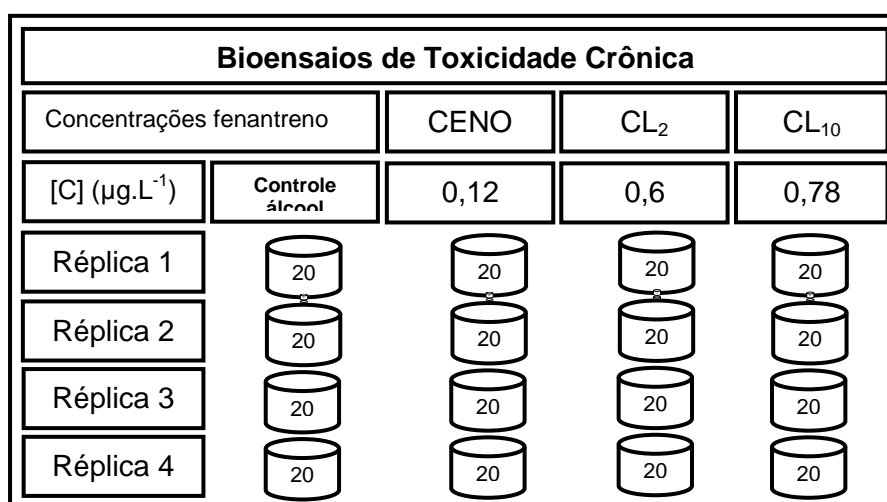


Figura 7: Representação esquemática dos bioensaios de toxicidade crônica com o hidrocarboneto fenantreno além d o controle contendo álcool, durante a fase larval de *Chironomus sancticaroli*.

4.6.2.1 *Endpoint* crescimento larval

Na tentativa de relacionar possíveis variações histológicas com efeitos de relevância ecológica, foram utilizadas 30 larvas vivas de cada concentração do bioensaio de toxicidade crônica para avaliar os efeitos do fenantreno no desenvolvimento larval. Foi mensurado o tamanho do corpo da larva, comprimento do primeiro segmento torácico até o último segmento abdominal, e o tamanho da antena, segundo Richardi *et al.* (2012) (Tabela 1). As análises foram executadas no ambiente R (R Development Core Team 2011). Para avaliar os efeitos das concentrações de fenantreno no tamanho do corpo das larvas, foi ajustado um modelo linear generalizado (GLM) utilizando uma distribuição de erro da família Gamma. Foi realizada uma ANOVA - one way e os contrastes de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizados para as comparações *a posteriori*. Para o GLM foram utilizadas as bibliotecas MASS (Venables & Ripley 2002) e “effects” (Fox, 2003) e para a análise *a posteriori* foi utilizada a biblioteca multcomp (Hothorn *et al.*, 2008).

Tabela 1: Medidas de tendência central e dispersão do tamanho da antena em cada ínstar de *Chironomus sancticaroli* segundo Richardi *et al.* (2012).

Ínstar	Mínimo	Máximo	Média	Intervalo de confiança
1º	0.037	0.044	0.040	0.0392-0.0408
2º	0.055	0.065	0.060	0.0593-0.0607
3º	0.092	0.112	0.102	0.1009-0.1031
4º	0.135	0.220	0.176	0.1739-0.1781

5. RESULTADOS

5.1 Teste de sensibilidade

Os testes 1, 4 e 12 não foram considerados, pois a mortalidade no controle excedeu 20%. A faixa de sensibilidade da espécie para o KCl variou de 3,26 a 5,58 g/L, com coeficiente de variação (CV) de 13,06% (Tabela 2, Figura 8).

5.2 Análise do sedimento

A análise granulométrica demonstrou que o sedimento possui partículas que vão de 0,06 μm a 2,36 μm , com predominância de 57% de material retido na peneira de 1,18 mm (Tabela 3). A análise química indicou predominância de 81,1% na amostra de dióxido de silício (SiO_2) e uma quantidade inferior a 10% de outros compostos (Tabela 4). O sedimento possui composição quartzo-feldspática, com 80% de quartzo e os 20 % restantes de albita e microclínio (tipos de feldspato) (Figura 9). As análises realizadas classificaram o sedimento como areia e, ainda demonstraram a inexistência de elementos que sejam tóxicos aos organismos e que pudessem interferir nos resultados.

Tabela 2: Valores da Concentração Letal ($\text{CL}_{50} - 96\text{h}$, g.L^{-1}) do Cloreto de Potássio (KCl) e dos intervalos de confiança (IC – 95%) de cada teste de sensibilidade com *Chironomus sancticaroli*.

Nº do Teste	Data	CL50 – 96h	IC (95%)
2	13/12/2010	4,03	3,29 - 4,94
3	20/01/2011	4,47	3,55 - 5,62
5	25/01/2011	5,54	5,04 - 6,09
6	27/01/2011	4,76	4,15 - 5,45
7	31/01/2011	4,55	3,95 - 5,24
8	11/07/2011	4,90	4,48 - 5,35
9	12/07/2011	4,85	4,16 - 5,66
10	12/07/2011	4,49	3,98 - 5,07
11	25/07/2011	4,44	3,92 - 5,05
13	03/09/2012	3,64	3,17 - 4,19
14	08/10/2012	4,21	3,63 - 4,89
15	05/11/2012	3,33	2,83 - 3,90
16	03/12/2012	4,73	4,15 - 5,38
Média (X)		4,42	
Variância (S^2)		0,33	
Desvio Padrão (S)		0,58	
Coef. Variação em % (CV)		13,06	

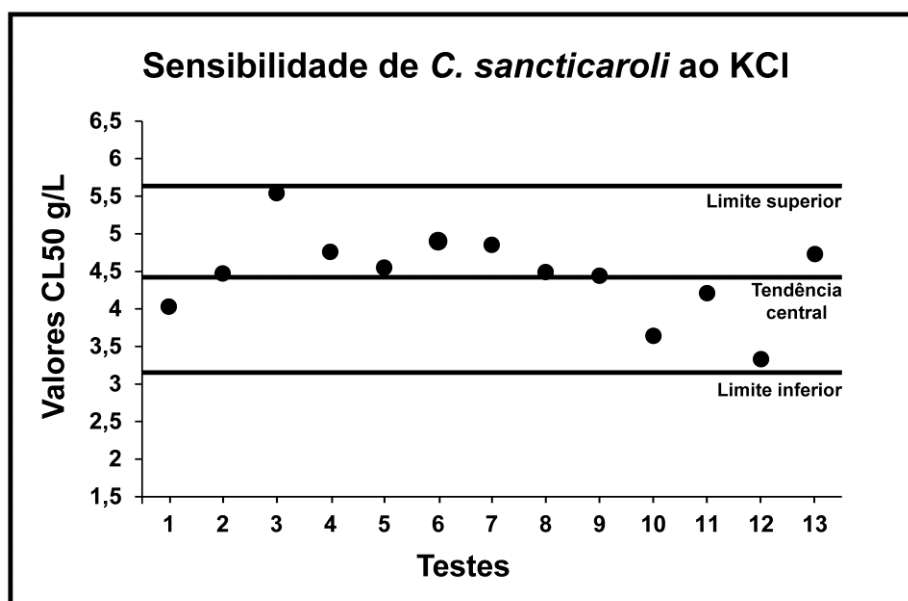


Figura 8: Concentrações Letais CL₅₀ – 96h (g/L) para cada um dos 13 testes realizados, bem como o limite superior e inferior da faixa sensibilidade de *Chironomus sancticaroli* ao Cloreto de Potássio (KCl).

Tabela 3: Análise granulométrica do sedimento utilizado no cultivo e bioensaios de *Chironomus sancticaroli*.

MALHAS (TYLER)	ABERTURA (mm)	MASSA RETIDA (g)	% PESO
8	2,36	6,16	3,08
14	1,18	114,03	57,02
42	0,355	75,15	37,58
80	0,18	3,79	1,89
170	0,09	0,8	0,4
250	0,063	0,07	0,04
325	0,044	0	0
< 325		0	0
MASSA FINAL (g):		200	

Tabela 4: Composição química do sedimento utilizado no cultivo e bioensaios com *Chironomus sancticaroli*

Concentração (%)	Composto							
	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Na ₂ O	K ₂ O	Fe ₂ O ₃	CaO	CO ₂	MgO
	81,1	10,4	2,6	2,5	1	1	0,7	0,3

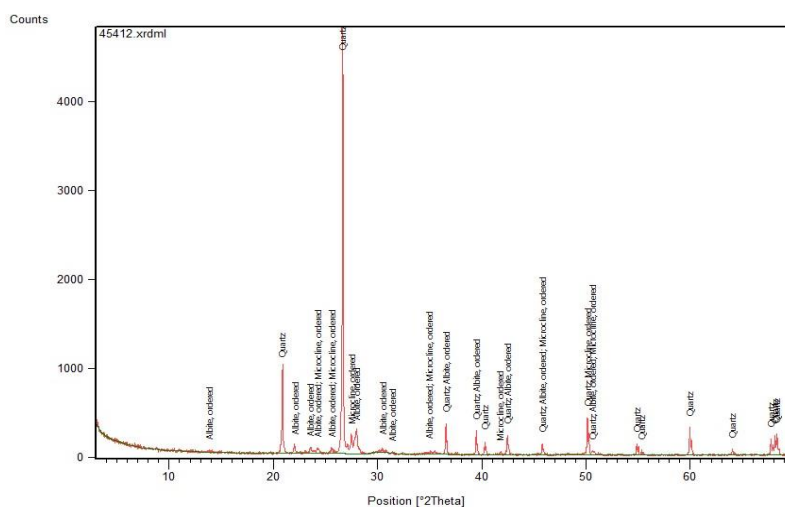


Figura 9: Difratoograma com os picos padrões do quartzo, microclínio e albita, presentes no sedimento utilizado no cultivo e bioensaios com *Chironomus sancticaroli*.

5.3 Descrição histológica

Avaliando a morfologia interna da larva de *C. sancticaroli* foi possível descrever uma série de órgãos e tipos celulares cada qual com sua função específica, cuja histologia será descrita na sequência (Figura 10).

5.3.1 Sistema Digestório

O tubo digestório das larvas de *Chironomus sancticaroli* é um conjunto de órgãos tubulares, que se estende da boca ao ânus, sendo claramente possível diferenciar três grandes regiões: estomodeu ou intestino anterior, mesêntero ou intestino médio e proctodeu ou intestino posterior.

O estomodeu e o proctodeu tem origem ectodérmica, por isso é possível observar claramente a presença de uma cutícula quitinosa, enquanto o mesêntero tem origem endodérmica e por isso não possui cutícula, porém possui uma membrana ou matriz peritrófica secretada por um tipo específico de células, denominadas de células de Cuénot (Figura 11).

5.3.1.1 Estomodeu ou intestino anterior

O esôfago é a primeira região do tubo digestório, sendo um órgão curto, não apresentando nenhuma região diferenciada como papo ou moela. Este órgão se estende a partir da boca até o metatórax. Na sua porção inicial é envolto por uma estrutura muscular denominada de colar periesofageano (Figura 12d). O epitélio de difícil observação é constituído por células pavimentosas não ultrapassando 6 µm de espessura com citoplasma basófilo, com núcleo grande (Figura 12e), em corte transversal é possível observar cinco dobras longitudinais do epitélio, bem evidentes (Figura 12f).

5.3.1.2 Mesêntero ou intestino médio

O intestino médio é a região de origem endodérmica do tubo digestório, por isso não apresenta cutícula, sendo observada nesta região a presença da membrana ou matriz peritrófica, a qual envolve o conteúdo alimentar para evitar a abrasão do alimento com o epitélio de revestimento. No mesêntero é possível observar três regiões, formadas por quatro diferentes tipos celulares.

No metatórax encontra-se a válvula estomodeal que limita o final do estomodeu e o início do mesêntero. Esta válvula é caracterizada por uma projeção do epitélio e da musculatura do esôfago para o interior do mesêntero. A válvula é formada por três partes: folhetos do esôfago, células de Cuénot e região dos cecos gástricos. Os folhetos do esôfago são constituídos por células cilíndricas com citoplasma acidófilo granuloso e núcleos pequenos e elípticos (Figura 13f).

As células de Cuénot são as responsáveis pela formação da membrana ou matriz peritrófica, e sua presença representa o início do mesêntero. As células de Cuénot que estão associadas a projeção esofágica, encontram-se agrupadas e exibem um tamanho reduzido em relação as células de Cuénot que não se encontram associadas a referida projeção, que são maiores. Estas células grandes apresentam núcleos esféricos, citoplasma fortemente basófilo e granuloso e ápice celular, com borda em escova (Figura 13d)

Seguido das células de Cuénot está a zona dos cecos gástricos, formada por três ou quatro coroas de quinze divertículos, sendo os cecos posteriores nitidamente maiores. São formados por células um pouco menores que as células

de Cuénot, globosas, com citoplasma eosinófilo granuloso, núcleos redondos grandes, sendo possível observar cromatina descondensada. As células dos cecos apresentam bordo em escova mais extenso que as células de Cuénot, representando um quinto do tamanho da célula (Figura 13e).

A região I do mesêntero é formada por células grandes de formato irregular, cuja região basal arredondada e convexa se projeta entre as fibras musculares adjacentes (Figura 14e). Em corte transversal o epitélio apresenta um contorno estrelado, enquanto o lúmen apresenta formato circular. Na região apical e basal do citoplasma da célula é possível observar uma linha de contorno mais eosinófila que o citoplasma, sendo este granuloso, o bordo em escova não é extenso (Figura 14e,f).

A região II apresenta células cúbicas com núcleos grandes e o citoplasma basófilo, exibindo no pólo basal regiões heterogeneamente coradas, na forma de estriações. (Figura 15e). É possível observar um conspícuo bordo em escova no pólo apical, mais extenso do que os das células da região I (Figura 15).

A região III é formada por células cúbicas, um pouco menores que a região anterior, com núcleos esféricos, o citoplasma dessas células tem uma forte basofilia e possui estriações perpendiculares à base da célula, as quais são mais evidentes do que a região anterior (Figura 16f). Na região abaixo do núcleo e no polo apical da célula, o citoplasma é granuloso e o bordo em escova é bem conspícuo representando um quarto do tamanho das células. Além da presença de células regenerativas isolados, localizadas na região basal do epitélio (Figura 16).

5.3.1.3 Proctodeu ou intestino posterior

A primeira região do proctodeu ou região valvular é formada por um epitélio composto de células cilíndricas, com citoplasma basófilo e núcleos localizados na região média-basal, contendo um único nucléolo e grânulos de cromatina na periferia (Figura 17c,e). A válvula é formada por um epitélio de revestimento contendo células cúbicas com citoplasma eosinófilo e núcleos com cromatina descompactada (Figura 17d,f)

A região do íleo é muito semelhante em estrutura ao esôfago, sendo composto por uma espessa camada muscular circular e um delgado epitélio de revestimento formado por células de limites imprecisos, com núcleo grande e

esférico contendo um único nucléolo e apresentando a cromatina disposta em grânulos periféricos. O delgado epitélio de revestimento forma numerosas dobras longitudinais revestidas por cutícula (Figura 18).

Na porção final do tubo digestório observa-se o cólon e o reto, os quais apresentam a mesma morfologia celular, formado por células grandes com região basal alongada, contendo núcleo grande e esférico. O citoplasma é ligeiramente basófilo, com a região basal e apical da célula eosinófilas (Figura 19).

5.3.2 Glândula salivar

As glândulas salivares são estruturas pares, saculiformes, levemente curvadas, acompanhando a parede dorsal do corpo, localizadas entre o esôfago, no segundo e terceiro segmento torácico da larva. As células epiteliais glandulares encontram-se dispostas em uma única camada, delimitando na porção secretora um grande lúmen central onde é depositada uma secreção eosinófila. As células glandulares apresentam núcleos grandes contendo cromossomos politênicos, o citoplasma é homogêneo e fortemente basófilo (Figura 20c,e). O ducto excretor abre-se no esôfago, sendo constituído por um epitélio cúbico, com núcleos esféricos, contendo cromatina condensada, e citoplasma basófilo (Figura 20d).

5.3.3 Sistema Excretor

A excreção nas larvas de *C. sancticaroli* é realizada pelos túbulos de Malpighi, principal órgão envolvido neste processo, e pelas células pericárdicas, associadas ao vaso dorsal.

5.3.3.1 Túbulos de Malpighi

Os túbulos de Malpighi são órgãos tubulares banhados pela hemolinfa e ficam praticamente livres na cavidade do corpo. A extremidade proximal se abre na primeira região do proctodeu, enquanto a extremidade distal apresenta-se fechada. São observados quatro túbulos de Malpighi nas larvas de *C. sancticaroli*.

O epitélio é formado por uma única camada de células pavimentosas, contendo o núcleo grande projetado para a luz. O citoplasma mostra-se eosinófilo e granuloso e no pólo apical da célula observa-se um bordo em escova curto de fácil observação. (Figura 21).

5.3.3.2 Células pericárdicas

As células pericárdicas são grandes, multinucleadas, com citoplasma eosinófilo e vacuolizado, encontradas associadas à parede do vaso dorsal (Figura 28f).

5.3.4 Sistema Nervoso

O sistema nervoso central da larva de *C. sancticaroli* é composto por um cérebro, pelo gânglio subesofageano, localizados no primeiro segmento torácico, uma cadeia nervosa ventral (com gânglios torácicos e abdominais). Além de um gânglio frontal, anterior ao cérebro e próximo à cavidade bucal.

5.3.4.1 Cérebro

O cérebro, também denominado de gânglio supraesofageano, é um órgão bilobado, localizado acima do esôfago, sendo organizado em camada cortical e medular e constituído pelas seguintes estruturas: lamela neural, perineuro, trofoblastos, camada cortical e neurópila.

A região cortical é constituída por três camadas, sendo a mais externa representada pela lamela neural, que corresponde a uma bainha que reveste o cérebro. A camada intermediária é caracterizada pela presença de células gliais, sendo subdividida em duas subcamadas, respectivamente, o perineuro e os trofoblastos. O perineuro corresponde a uma camada de células gliais, dispostas de forma epitelióide. A associação da lamela neural com o perineuro constitui a bainha nervosa. Ainda, células gliais frouxamente arranjadas, denominadas de trofoblastos, nutrem os neurônios que tem o corpo celular, com cromatina nuclear condensada e citoplasma perinuclear basófilo, localizados na camada profunda da

região cortical. A região medular do cérebro é caracterizada pela neurópila, região formada pelos axônios dos neurônios (Figura 22c,f).

5.3.4.2 Cadeia nervosa ventral

A cadeia nervosa ventral é constituída por três gânglios torácicos e oito abdominais que estão ligados entre si e ao gânglio subesofageano por conectivos pares, sendo estes formados pelos axônios dos neurônios envoltos pela lamela neural. O primeiro gânglio abdominal encontra-se deslocado e localizado no metatórax da larva, sendo os torácicos um pouco maiores que os abdominais. A estrutura celular dos gânglios da cadeia nervosa é semelhante àquela descrita para o cérebro, entretanto os corpos celulares no gânglio estão localizados na face ventral (Figura 22d-e).

5.3.5 Sistema endócrino ou complexo retrocerebral

O complexo retrocerebral é composto pela *corpora allata*, *corpora cardiaca*, glândula protorácica e outras glândulas neuroendócrinas presentes em outras regiões do sistema nervoso (Figura 23).

5.3.5.1 *Corpora allata*

Corpora allata são estruturas esféricas pareadas, constituídas por epitélio glandular formado por poucas células, de tamanhos variados, com núcleo central contendo cromatina agregada e nucléolo evidente e o citoplasma vacuolizado. Localizam-se próximas à aorta, posteriormente ao cérebro e a glândula salivar (Figura 24c-d).

5.3.5.2 Glândulas protorácicas

As glândulas protorácicas são formadas por células ligeiramente piramidais, com citoplasma basófilo e núcleos grandes, variando de esféricos a ovalados, com a cromatina disposta em grumos. Encontram-se dispostas longitudinalmente, envolvendo as traquéias cefálicas (Figura 24e-f).

5.3.5.3 Glândulas póscerebrais anteriores

As glândulas póscerebrais anteriores são estruturas pares e unicelulares. A célula de tamanho grande apresenta núcleo intensamente corado, devido à condensação da cromatina, e citoplasma com granulações e vacúolos. Localizam-se intimamente associadas com a parede do esôfago (Figura 25c-d).

5.3.5.4 *Corpora cardiaca*

Corpora cardiaca são estruturas pareadas, formadas por um conjunto de pequenas células de formato irregular, com citoplasma vacuolizado e núcleos com cromatina condensada. Localizam-se próximas às traquéias cefálicas dorsais, entre as glândulas poscerebrais anteriores e a glândula protorácica (Figura 25c,e).

5.3.6 Corpo gorduroso

O corpo gorduroso é o tecido que preenche as cavidades do corpo do inseto, podendo ser de dois tipos, de acordo com a sua localização, corpo gorduroso parietal ou corpo gorduroso visceral.

O corpo gorduroso parietal localiza-se entre a epiderme e os músculos intersegmentais, enquanto o corpo gorduroso visceral distribui-se entre os órgãos internos da larva.

O corpo gorduroso parietal apresenta dois tipos celulares, os trofócitos e os enócitos, enquanto o visceral é constituído somente por trofócitos.

5.3.6.1 Trofócitos

Os trofócitos do corpo gorduroso parietal são células pequenas e formam uma massa contínua associada ao tegumento da larva, enquanto as células do corpo gorduroso visceral são maiores e formam massas celulares que preenchem os espaços entre os órgãos.

Os trofócitos dos corpos gordurosos parietal e visceral apresentam o citoplasma com aspecto vacuolizado e sem afinidade pelos corantes Hematoxilina e Eosina, sendo basófilo na região perinuclear. O núcleo é esférico e pequeno, em relação ao volume citoplasmático, a cromatina mostra-se bem condensada (Figura 26).

5.3.6.2 Enócitos

Os enócitos são células grandes, com aspecto globoso, maiores que os trofócitos, porém, apresentam-se em menor quantidade. O citoplasma é acidófilo e o núcleo é central com um nucléolo único e a cromatina em grumos. Estas células podem ocorrer isoladas ou em grupos, constituídos de três a quatro células, sendo as células isoladas maiores do que as agrupadas. Em células isoladas foi possível observar grânulos citoplasmáticos. Os enócitos maiores que se encontram agrupados possuem um citoplasma perinuclear basófilo e no núcleo evidencia um único nucléolo e a cromatina distribuída na periferia. Os enócitos localizam-se dispersos no corpo gorduroso parietal (Figura 27).

5.3.7 Sistema circulatório

O sistema circulatório em Chironomidae é constituído pelo coração, localizado na região posterior do corpo, e pela aorta, vaso que sai do coração e vai até a cabeça da larva.

5.3.7.1 Coração

O coração esta localizado na região dorsal, precisamente no oitavo segmento abdominal. O referido órgão apresenta uma câmara revestida por uma parede muscular contrátil, delgada e de difícil observação na microscopia de luz. Na parede muscular abrem-se os óstios, que permitem a entrada da hemolinfa (Figura 28c).

5.3.7.2 Aorta

A aorta está localizada dorsalmente, acima do tubo digestório. Estende-se da região do coração à região da cabeça, com sua extremidade cefálica semelhante a uma trombeta. Ao longo de sua extensão foi possível observar válvulas que impedem o refluxo da hemolinfa (Figura 28e). As células que formam a parede da aorta são pavimentosas, com pouco citoplasma e núcleo achatado, contendo cromatina condensada na periferia (Figura 28d). Ainda, associadas com a aorta, é registrada a presença de células pericárdicas (Figura 28f).

5.3.8 Tegumento

O tegumento é formado por uma epiderme e uma cutícula quitinosa. A epiderme é formada por uma camada única de células cúbicas que no corpo da larva pode apresentar dobras, apresentando citoplasma eosinófilo e núcleos esféricos com cromatina condensada. A cutícula, que reveste a epiderme, é formada por três camadas, sendo a epicutícula a mais externa e de difícil visualização na microscopia de luz, a exocutícula a camada intermediária e a endocutícula a mais interna.

5.3.8.1 Cápsula cefálica

A cápsula cefálica é uma estrutura fortemente esclerotizada, por isso é possível observar uma delgada endocutícula, uma camada mais espessa de exocutícula e uma epicutícula extremamente fina e de difícil observação (Figura 29c).

5.3.8.2 Corpo

O corpo das larvas é flexível, por isso não é fortemente esclerotizado, sendo a cutícula representada por uma quantidade maior de endocutícula, tendo redução nas espessuras das camadas de exocutícula e epicutícula (Figura 29d).

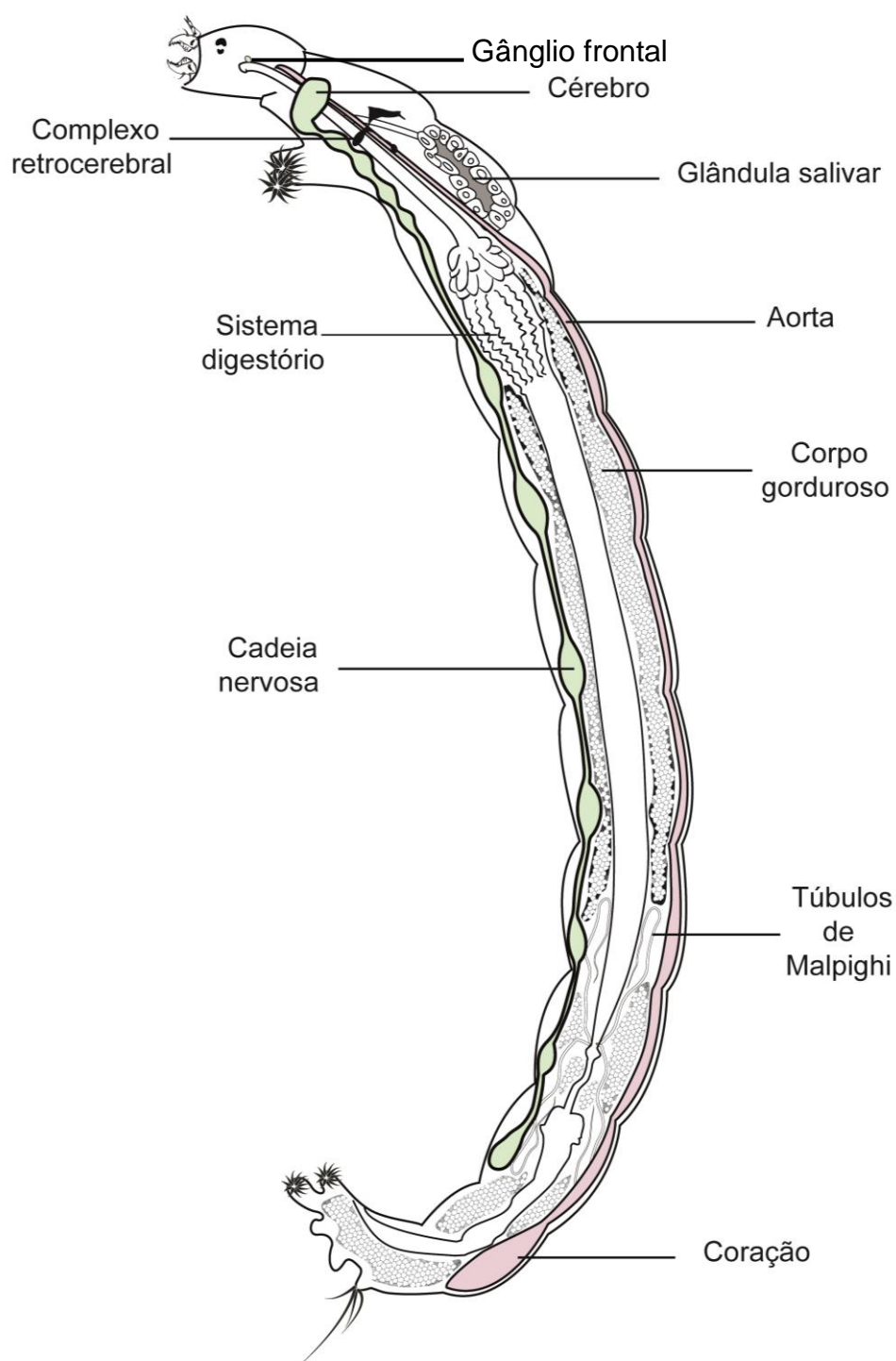


Figura 10: Representação esquemática da morfologia interna da larva de *Chironomus sancticaroli* com os principais sistemas e órgãos avaliados.

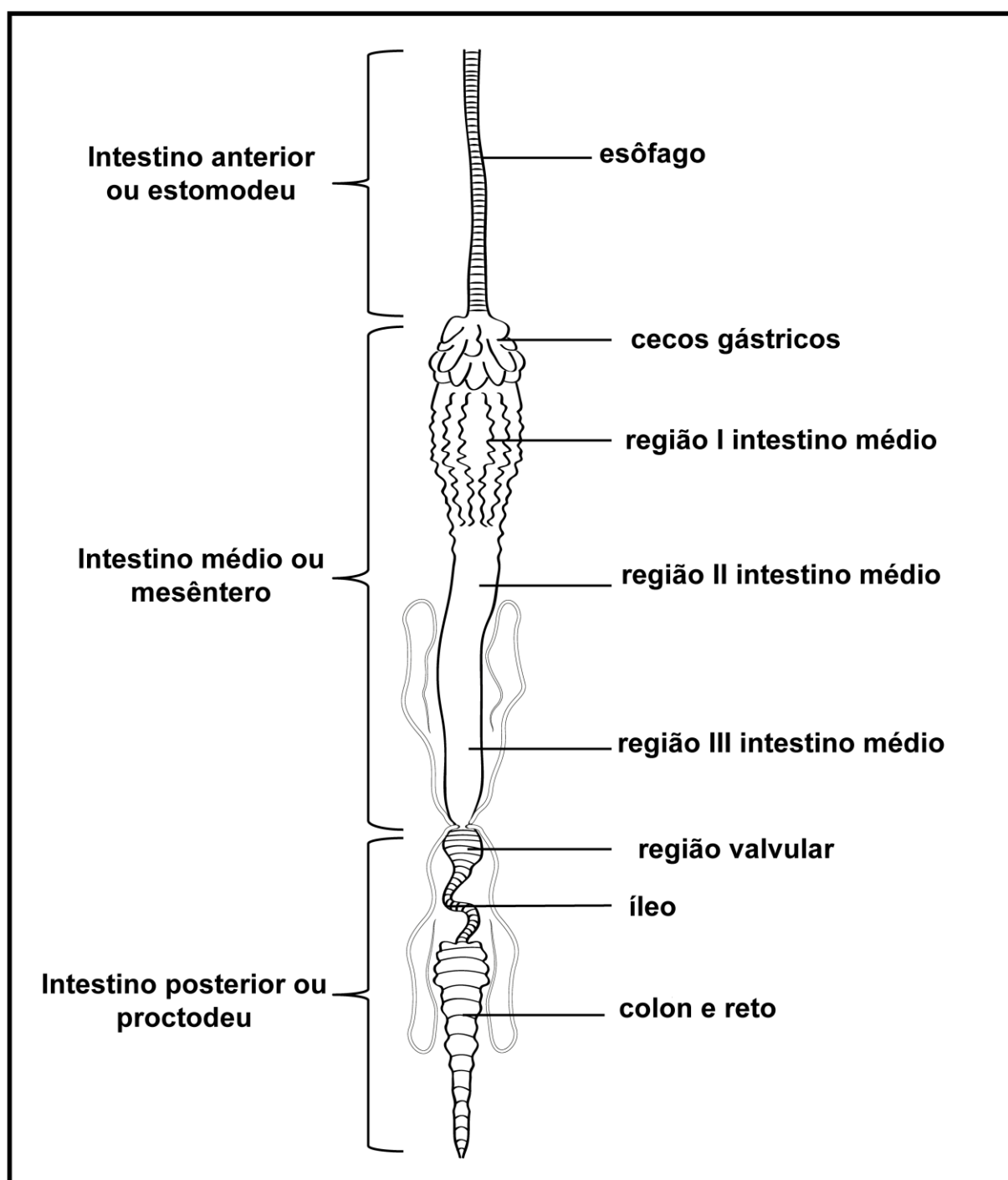


Figura 11: Representação esquemática sistema digestório da larva de *Chironomus sancticaroli* evidenciando as regiões funcionais.

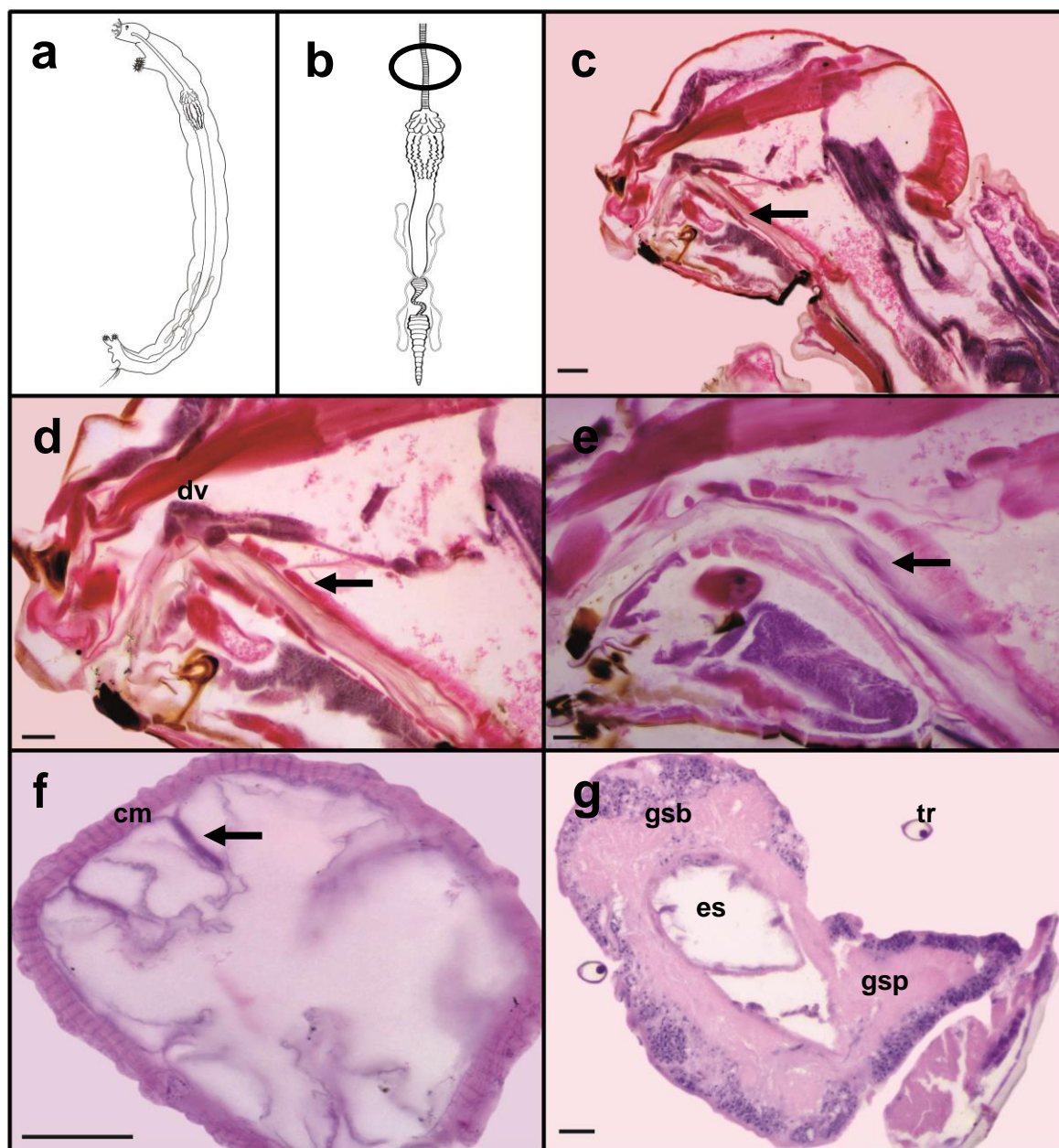


Figura 12: Região do esôfago da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: corte longitudinal da região cefálica da larva, em destaque o esôfago (seta). d: corte longitudinal do esôfago com os anéis musculares ou collar periesofageano (seta). e: corte longitudinal do esôfago evidenciando o epitélio de revestimento (seta) f: corte transversal no esôfago com as cristas longitudinais formadas pelo epitélio (seta) e a camada muscular longitudinal. g: corte transversal no esôfago na região do cérebro demonstrando o complexo círculo-esofageano. cm: camada muscular; dv: divertículo; es: esôfago; gsb: gânglio subesofageano; gsp: glânglio supra-esofageano (cérebro) e tr: traquéia. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

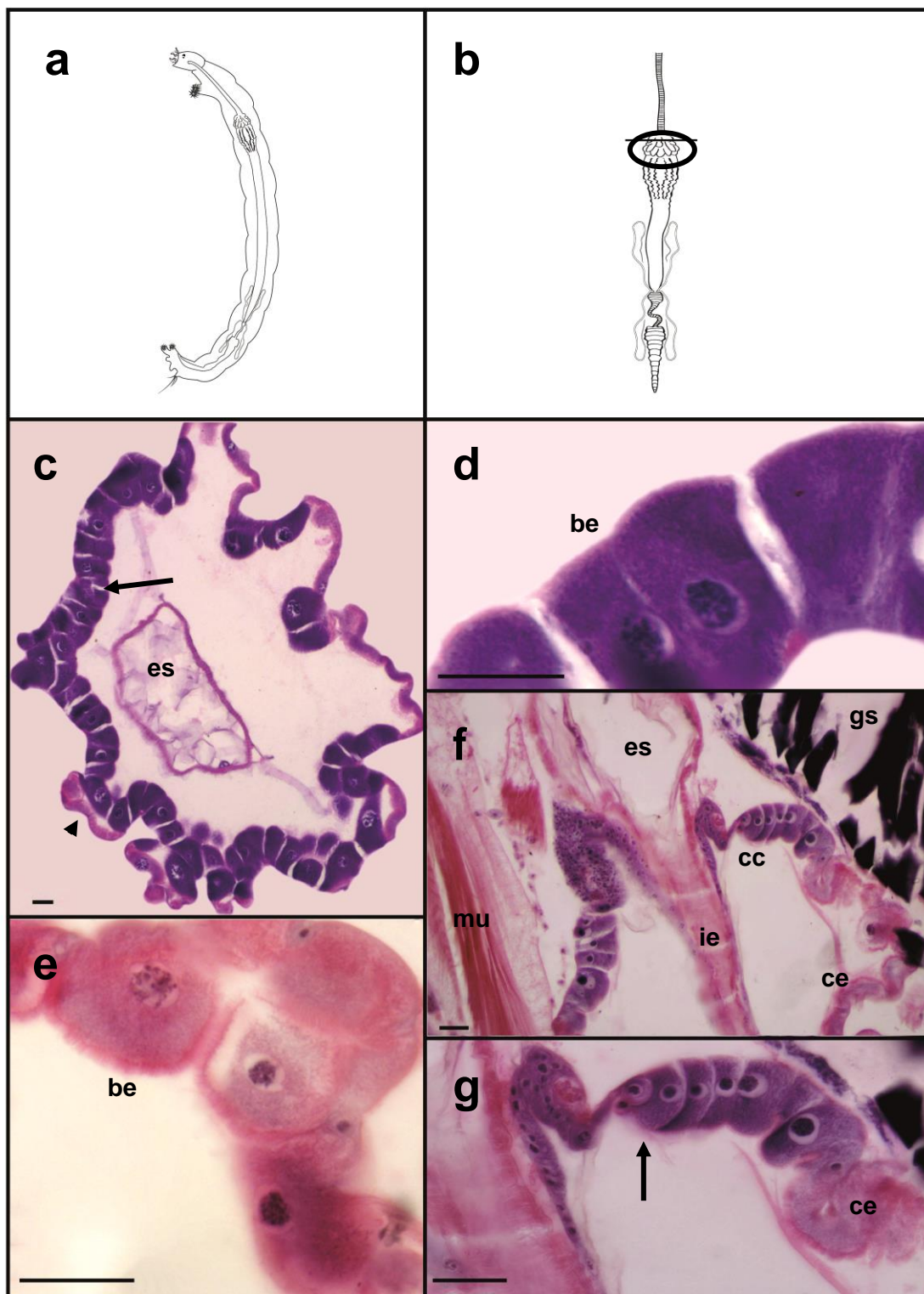


Figura 13: Região da válvula estomodeal da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: corte transversal da região dos cecos da larva, observar as células de Cuénot (seta), células dos cecos (cabeça de seta) e esôfago. d: em detalhe células de Cuénot. e: em detalhe células dos cecos gástricos. f: corte longitudinal da região dos cecos evidenciando a válvula estomodeal. g: corte longitudinal da válvula estomodeal demonstrando a região produtora da matriz peritrófica (seta). be: bordo em escova; cc: células de Cuénot; ce: células dos cecos; es: esôfago; gs: glândula salivar; ie: invaginação esôfago e mu: músculo. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.

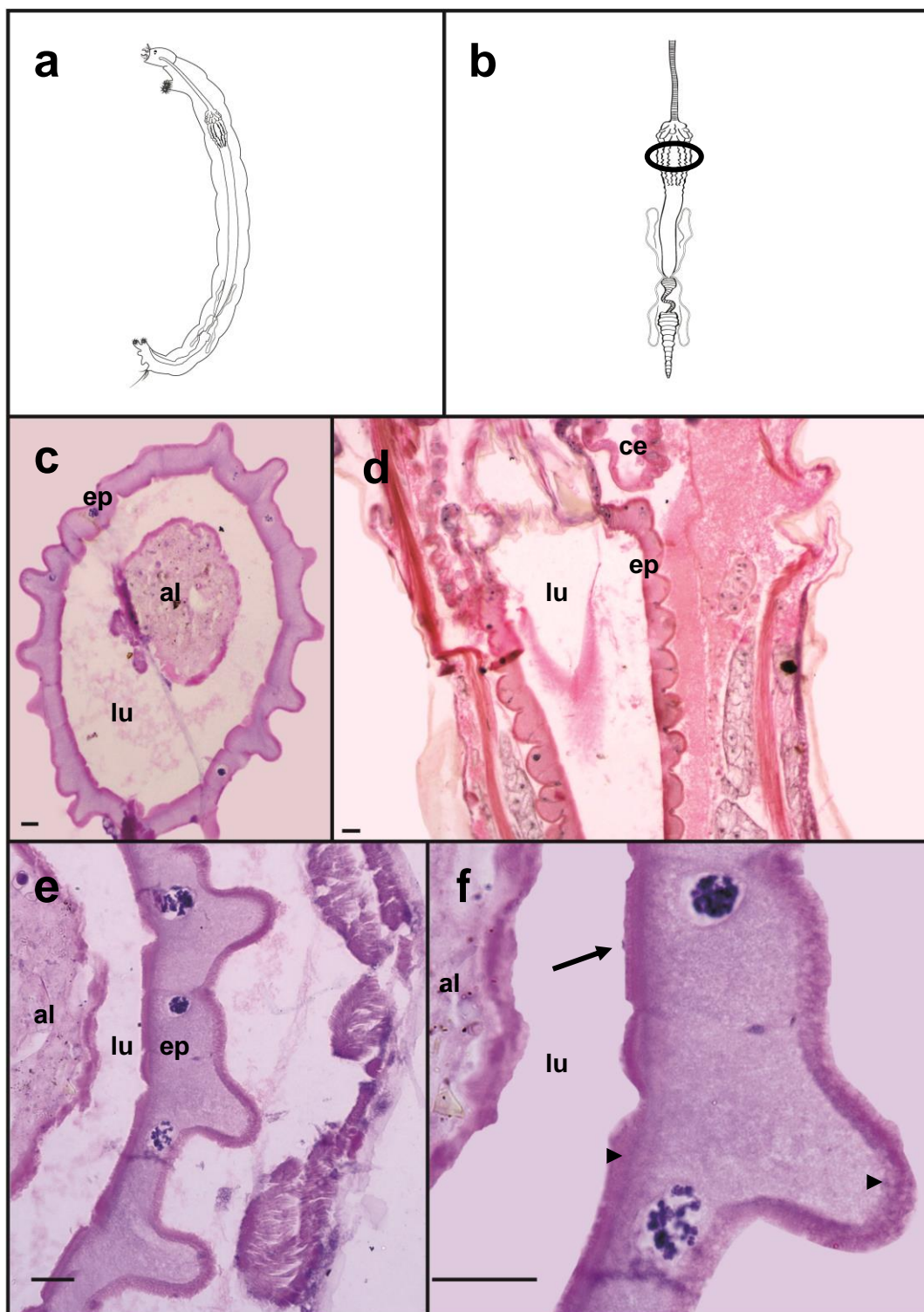


Figura 14: Região I do intestino médio da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: corte transversal da região I do intestino médio. d: corte longitudinal da região I do intestino médio. e-f: célula formadora do epitélio da região I do intestino médio, demonstrando o bordo em escova (seta) e a eosinofilia apical e basal da célula (cabeça de seta). al: alimento; ce: cecos; ep: epitélio; lu: lúmen do intestino. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.

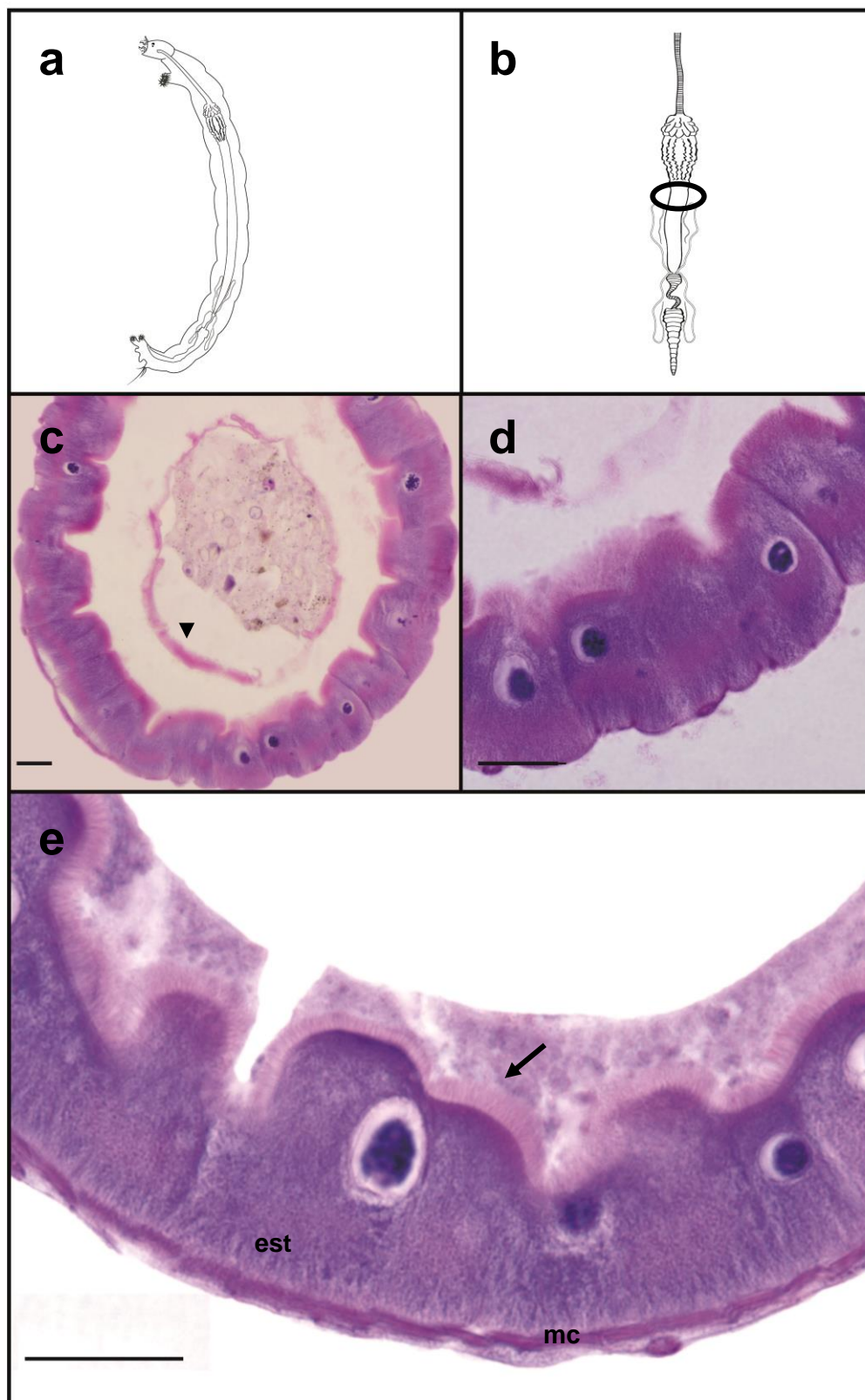


Figura 15: Região II do intestino médio da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c-e: corte transversal da região II do intestino médio, sendo possível observar o bordo em escova (seta) e a matriz peritrófica (cabeça de seta). est: estrias aparentes formadas por invaginações da membrana não coradas e mc: camada muscular circular. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

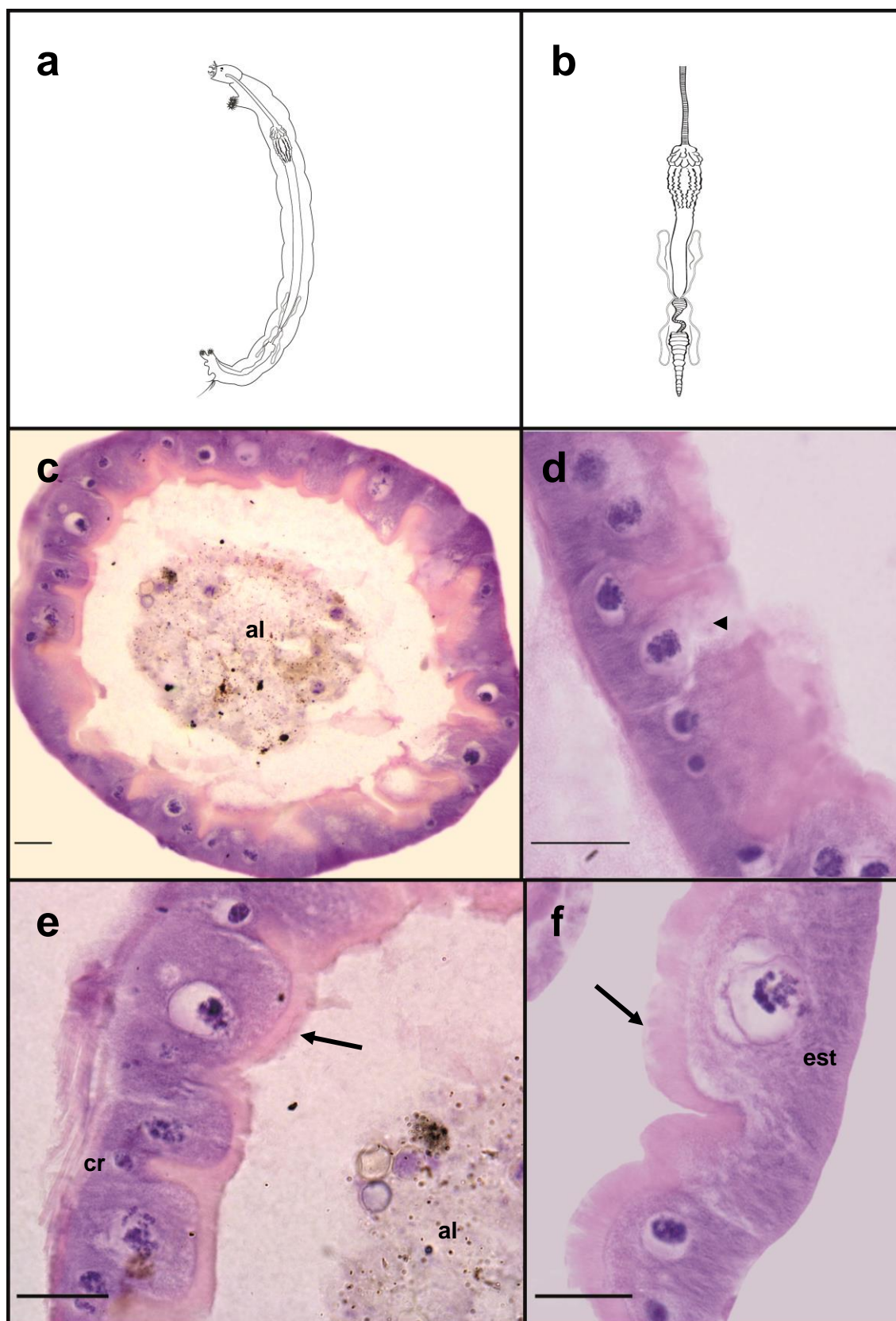


Figura 16: Região III do intestino médio da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c-f: corte transversal da região III do intestino médio, sendo possível observar o bordo em escova (seta), células em processo de secreção (cabeça de seta) e células regenerativas. al: alimento; cr: células regenerativas; est: estrias aparentes formadas por invaginações da membrana não coradas. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

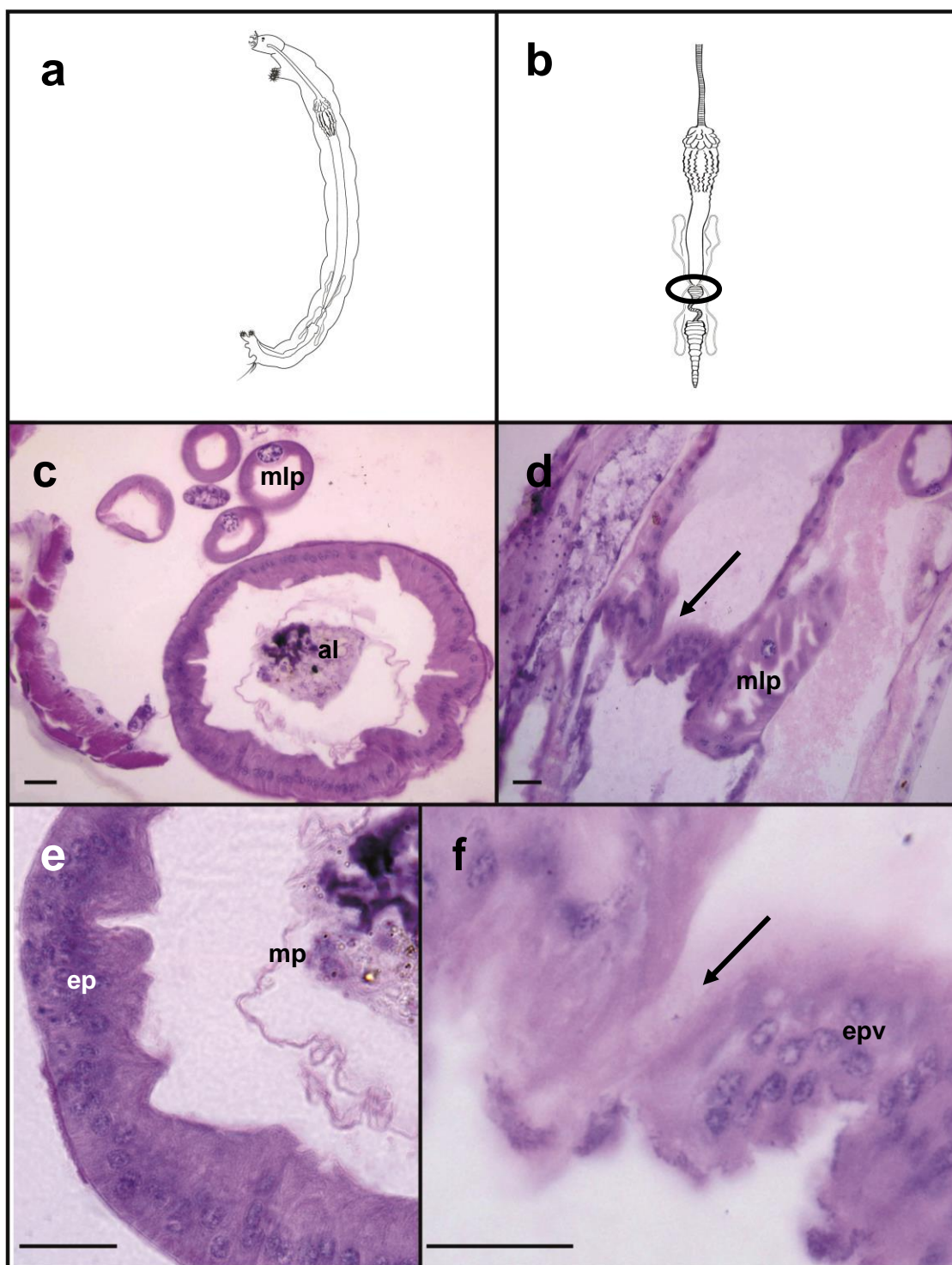


Figura 17: Região valvular do intestino posterior da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c,e: corte transversal do epitélio de transição entre intestino médio e posterior. d,f: corte longitudinal da região de transição entre intestino médio e posterior, demonstrando a válvula proctodeal (seta). al: alimento; ep: epitélio; epv: epitélio válvula; mlp: túbulos de Malpighi e mp: matriz peritrófica. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μm.

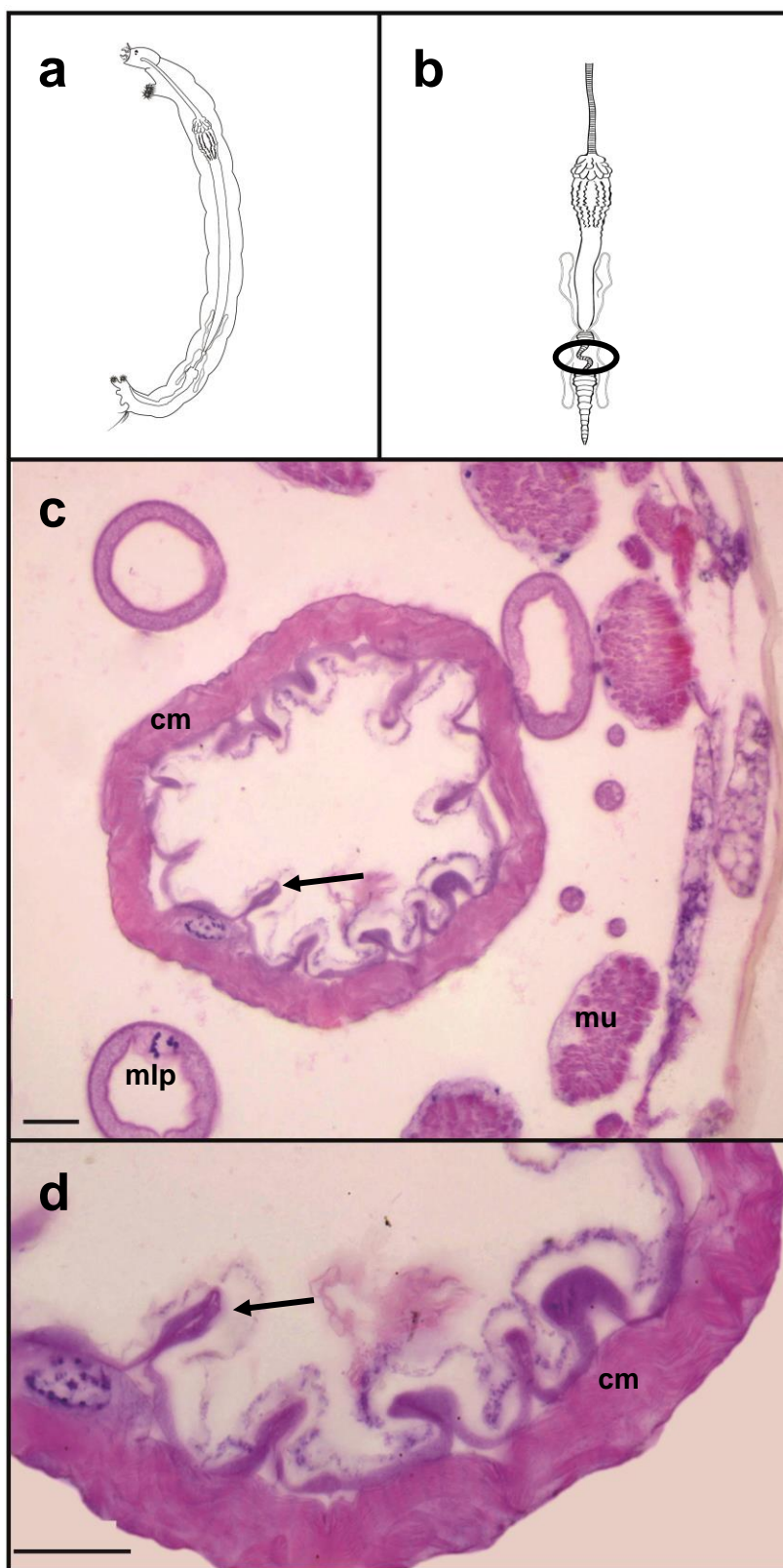


Figura 18: Região do íleo no intestino posterior da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c-d: cortes transversais do íleo evidenciando a densa camada muscular e as vilosidades formadas pelo epitélio (seta). cm: camada muscular; mlp: túbulos de Malpighi e mu: músculo. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

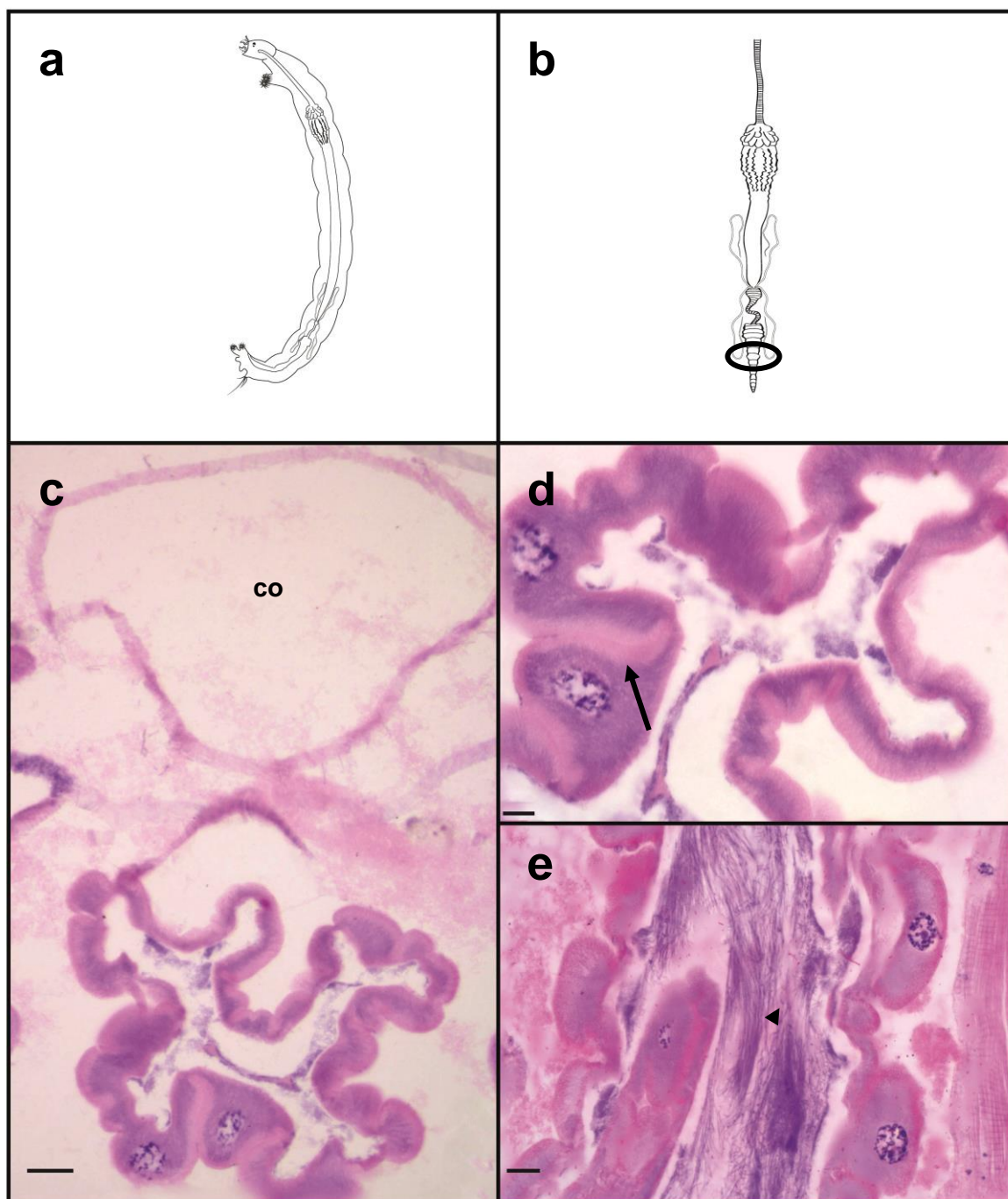


Figura 19: Região do colón e reto no intestino posterior da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c-d: corte transversal do epitélio do colón e reto demonstrando a eosinofilia basal da célula (seta). e: corte longitudinal do reto evidenciando o conteúdo basófilo (cabeça de seta). co: coração. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

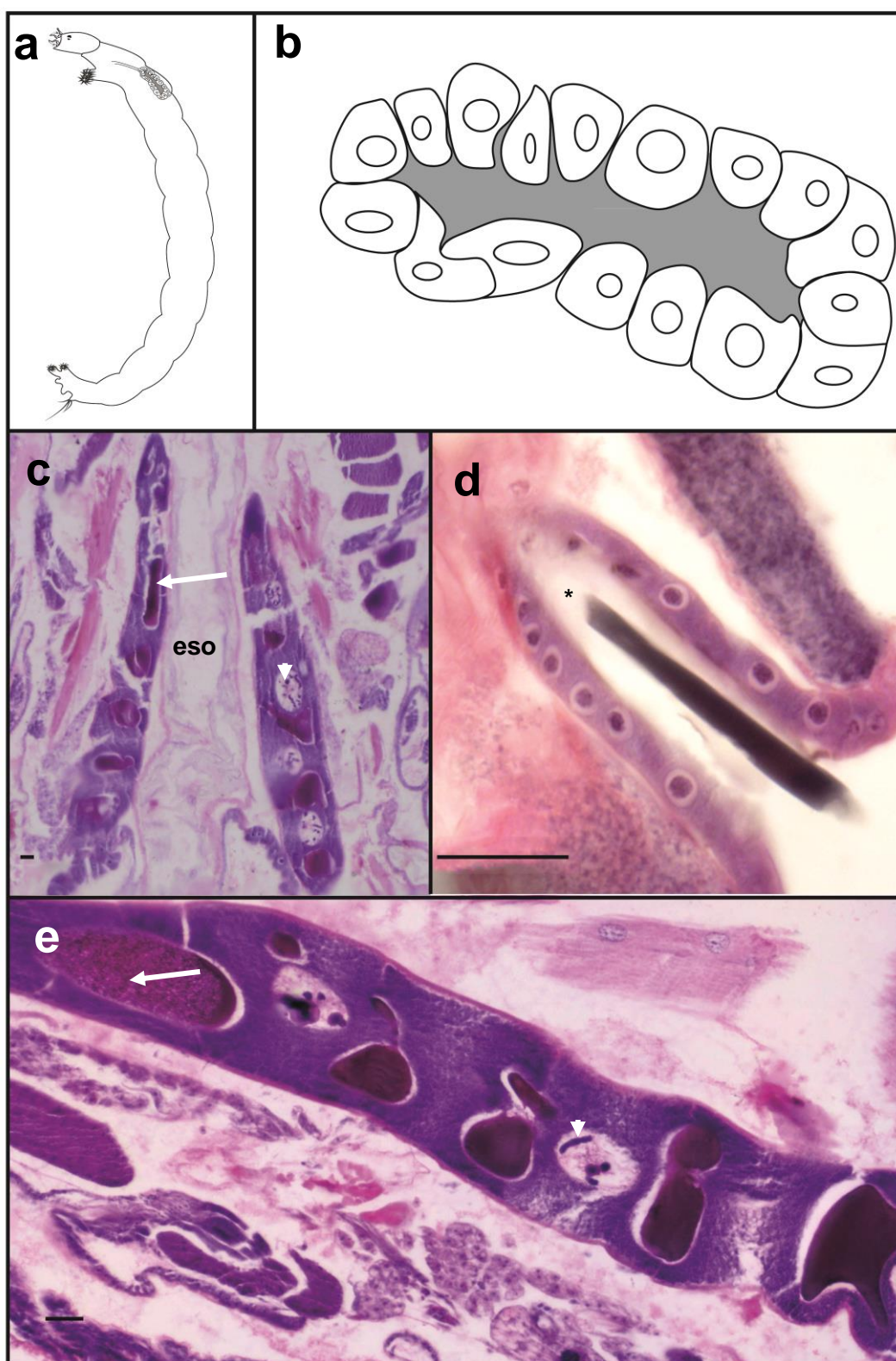


Figura 20: Glândula salivar da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização da glândula salivar na larva. b: esquema detalhado da glândula salivar. c,e: corte tangencial da glândula salivar evidenciando partes do lúmen contendo a secreção (seta) e as células, destacando o núcleo com cromossomos politênicos (cabeça de seta). d: corte longitudinal do ducto da glândula salivar, observar a presença de conteúdo no lúmen (*). eso: esôfago. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.

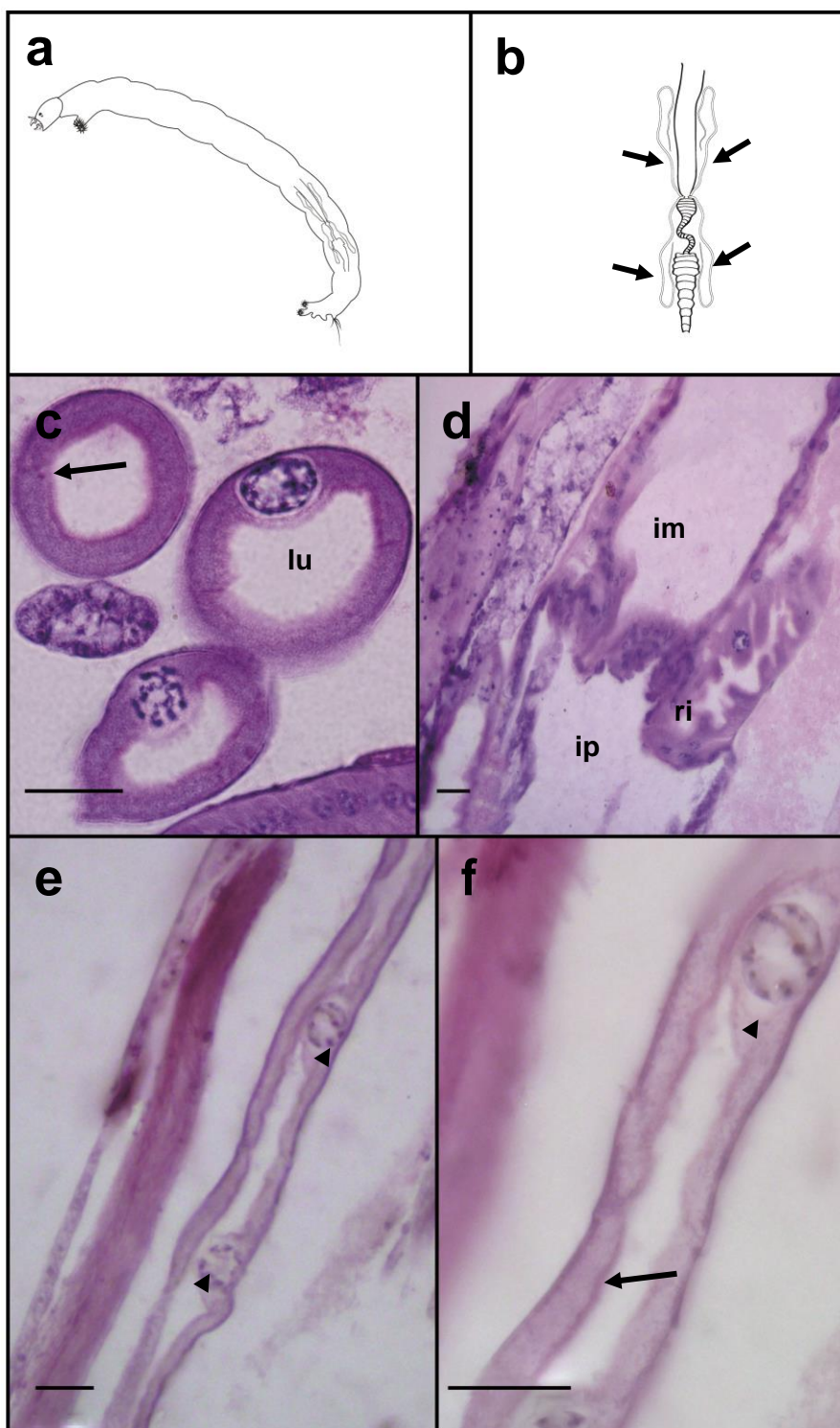


Figura 21: Túbulos de Malpighi da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização dos túbulos na larva b: esquema demonstrando a disposição e local de inserção dos túbulos nos sistema digestório (setas). c: corte transversal dos túbulos com o lúmen e o bordo em escova (seta). d: corte longitudinal evidenciando o local de inserção de um túbulo no sistema digestório. e-f: corte longitudinal de um túbulo com o bordo em escova (seta) e a projeção da porção citoplasmática contendo o núcleo para o lúmen (cabeça de seta). im: intestino médio; ip: intestino posterior; lu: lúmen do túbulo e ri: região de inserção. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

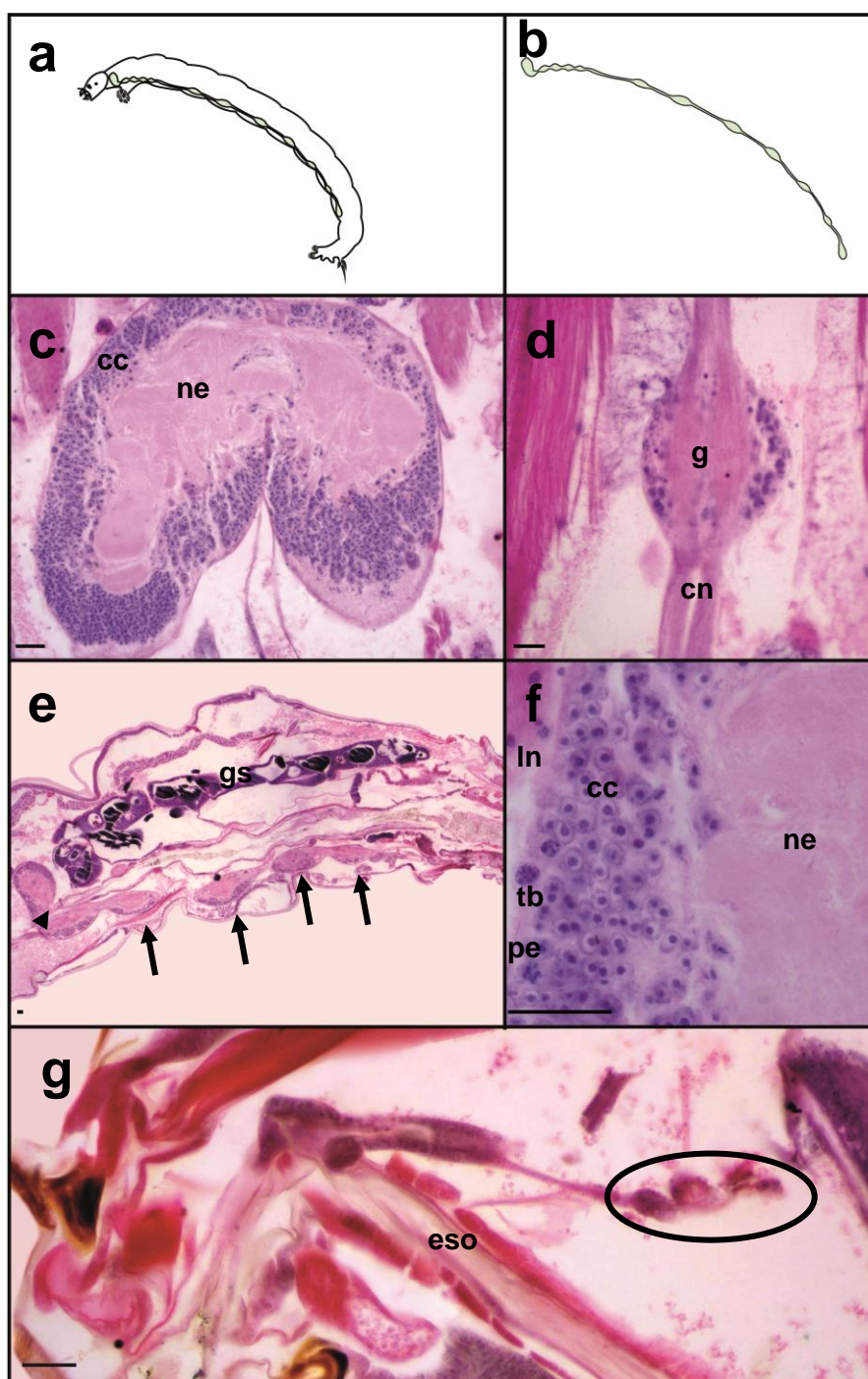


Figura 22: Sistema nervoso da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema nervoso na larva. b: esquema da anatomia dos principais componentes do sistema nervoso. c: corte longitudinal do cérebro demonstrando a região cortical e neurópila d: corte longitudinal de um gânglio da corda nervosa e um feixe conectivo formado por axônios. e: corte longitudinal evidenciando o cérebro (cabeça de seta) e os gânglios torácicos e o primeiro abdominal da cadeia nervosa ventral (seta). f: corte transversal do cérebro. g: corte longitudinal da região cefálica da larva com destaque no gânglio frontal (círculo), anterior ao cérebro. cc: camada cortical; cn: conectivo; eso: esôfago; g: gânglio; gs: glândula salivar; ln: lamela neural; ne: neurópila; pe: perineuro e tb: trofoblasto. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

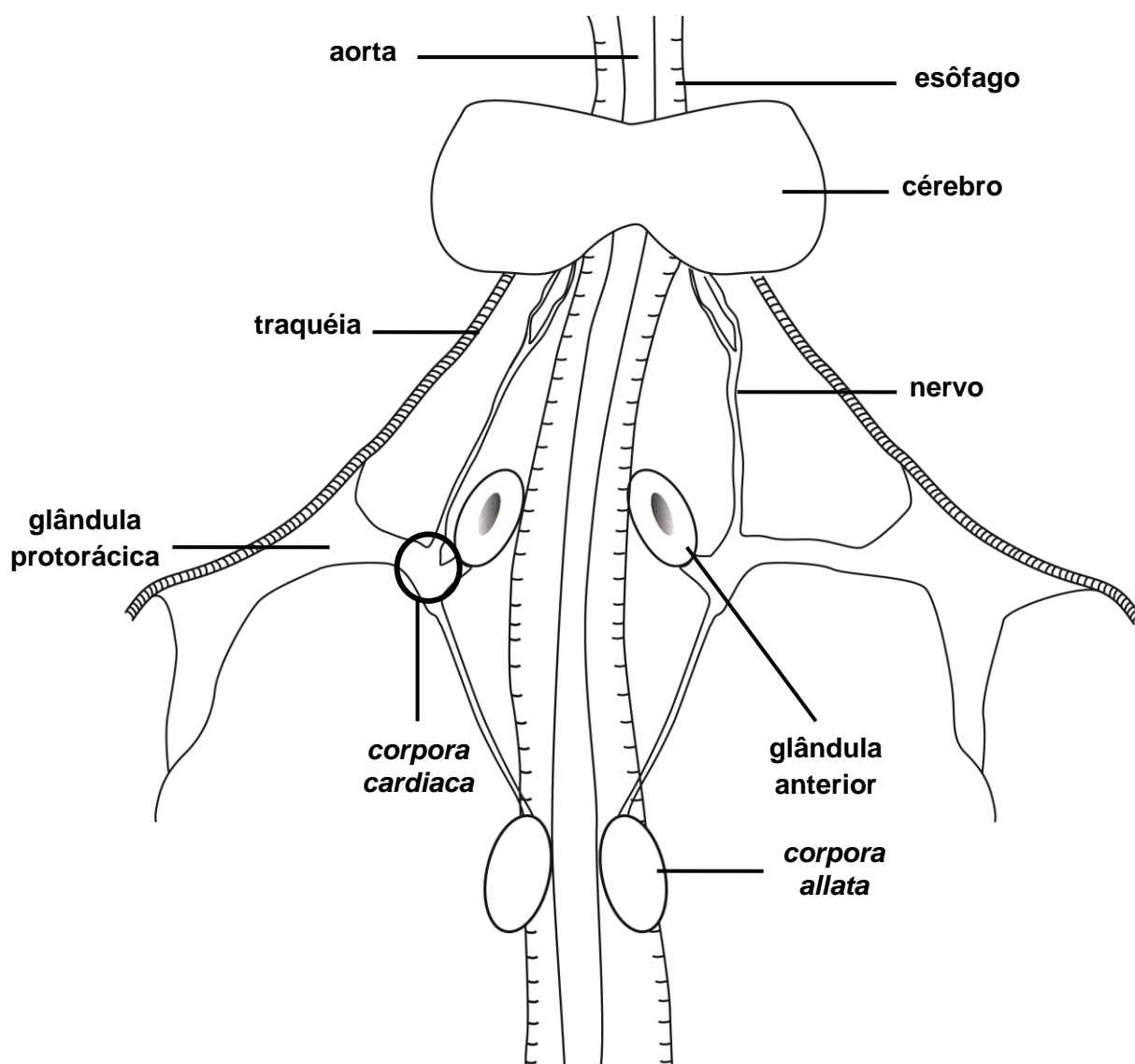


Figura 23: Representação esquemática do complexo retrocerebral da larva de *Chironomus sancticaroli*, demonstrando as principais glândulas.

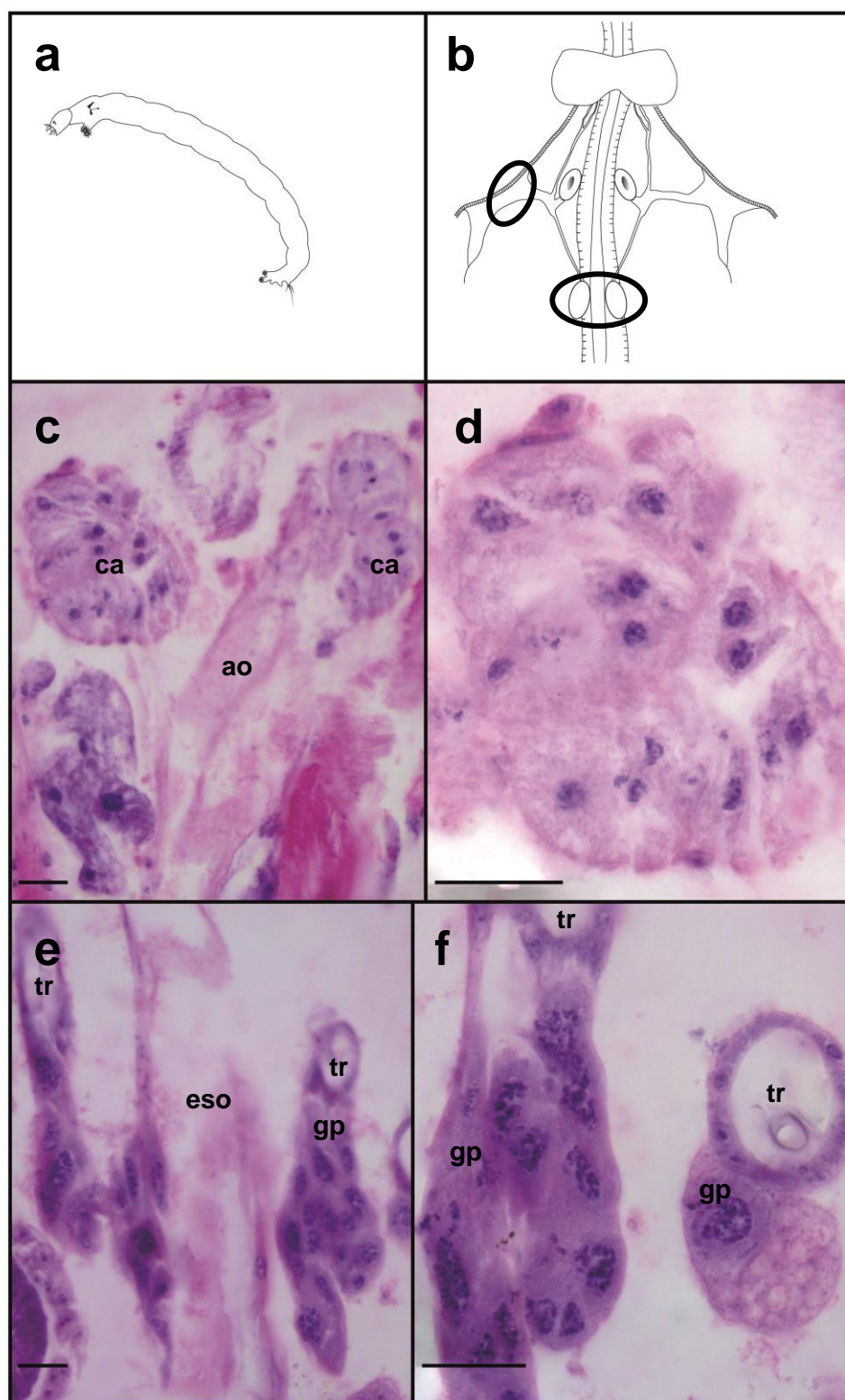


Figura 24: Glândulas do complexo retrocerebral da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do complexo retrocerebral na larva. b: em destaque, no círculo, regiões tratadas nas micrografias. c-d: corte longitudinal da *corpora allata* demonstrando o epitélio glandular. e-f: corte longitudinal da glândula protorácica. ao: aorta; ca: *corpora allata*; eso: esôfago; gp: glândula protorácica e tr: traquéia. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

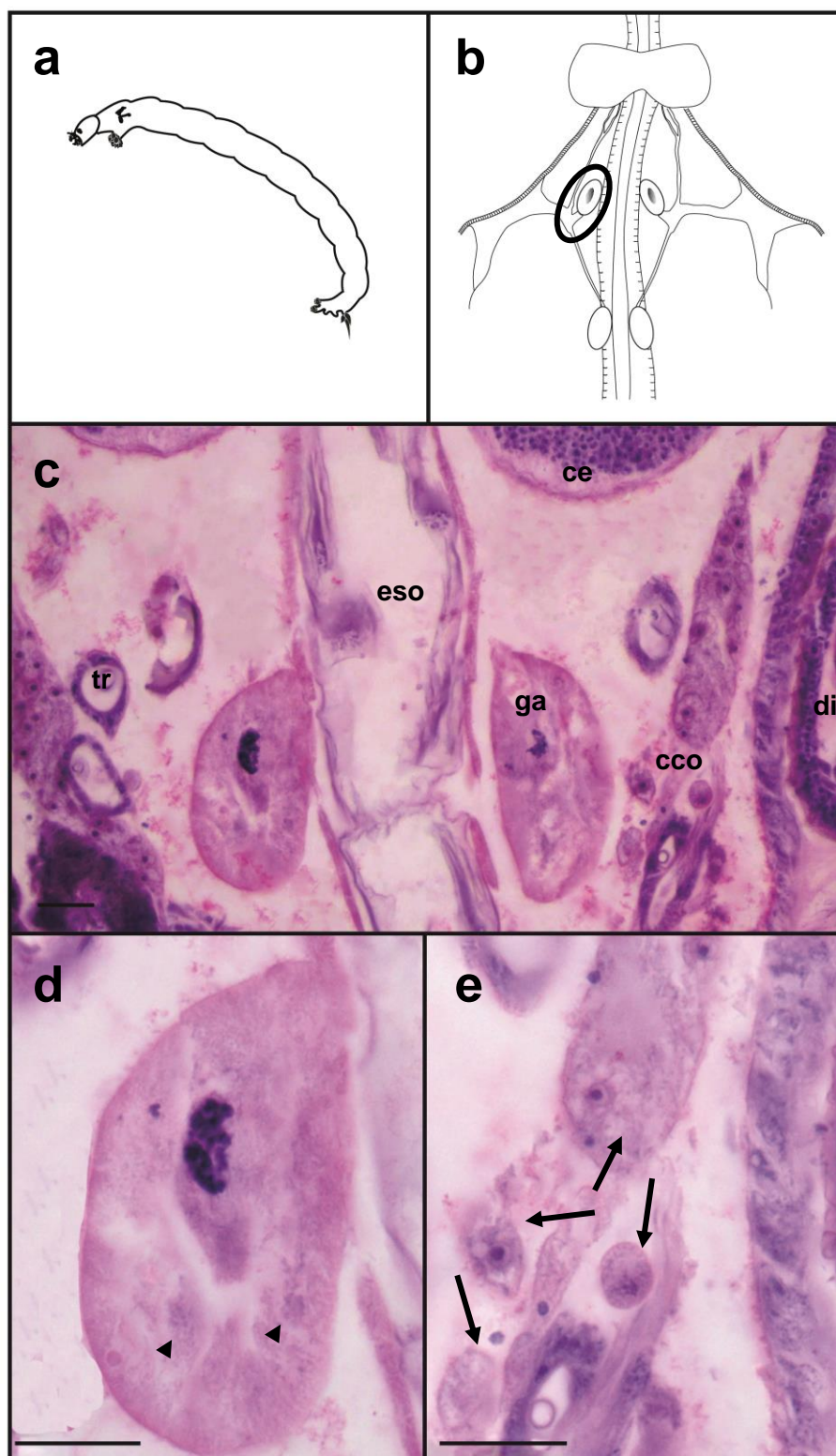


Figura 25: Glândulas do complexo retrocerebral da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do complexo retrocerebral na larva. b: em destaque, no círculo, regiões tratadas nas micrografias. c: corte longitudinal da região do complexo demonstrando a glândula poscerebral anterior e o pequeno grupo de células que compõem a *corpora cardiaca*. d: detalhe da glândula poscerebral anterior, notar granulações no seu citoplasma (cabeça de seta) e: detalhe do pequeno grupo de células que compõem a *corpora cardiaca* (setas). cco: *corpora cardiaca*; ce: cérebro; di: discos imaginais; eso: esôfago; ga: glândula poscerebral anterior e tr: traquéia. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

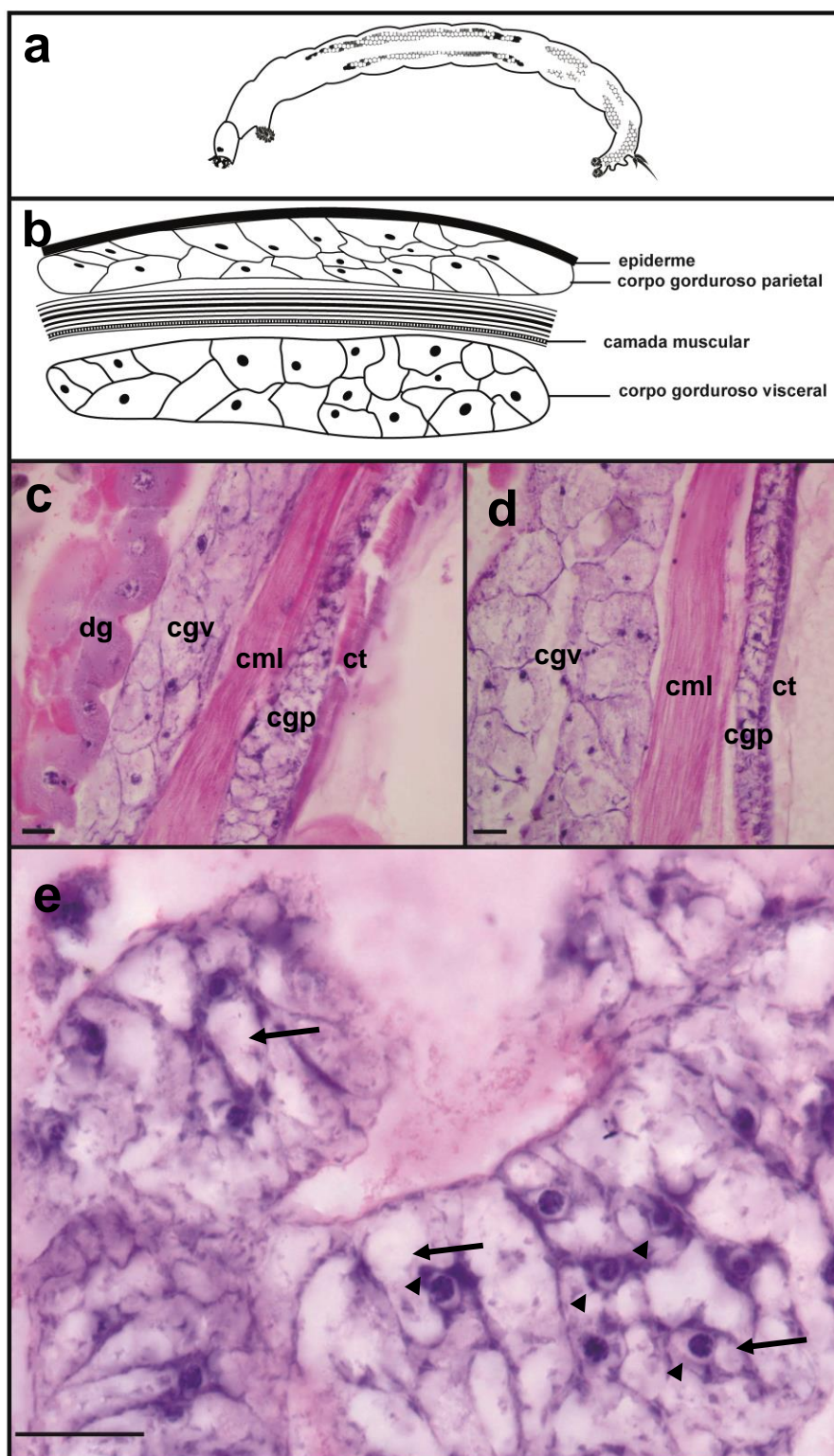


Figura 26: Corpo gorduroso da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do corpo gorduroso na larva. b: esquema da disposição desse órgão na larva. c-d: corte longitudinal do corpo gorduroso demonstrando o corpo gorduroso parietal e visceral. e: em detalhe os trofócitos do corpo gorduroso visceral, células que estão em maior quantidade neste tecido, notar o citoplasma perinuclear (cabeça de seta) e os vacúolos preenchendo o citoplasma da célula (setas). cgp: corpo gorduroso parietal; cgv: corpo gorduroso visceral; cml: camada muscular longitudinal; ct: cutícula e dg: tubo digestório. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

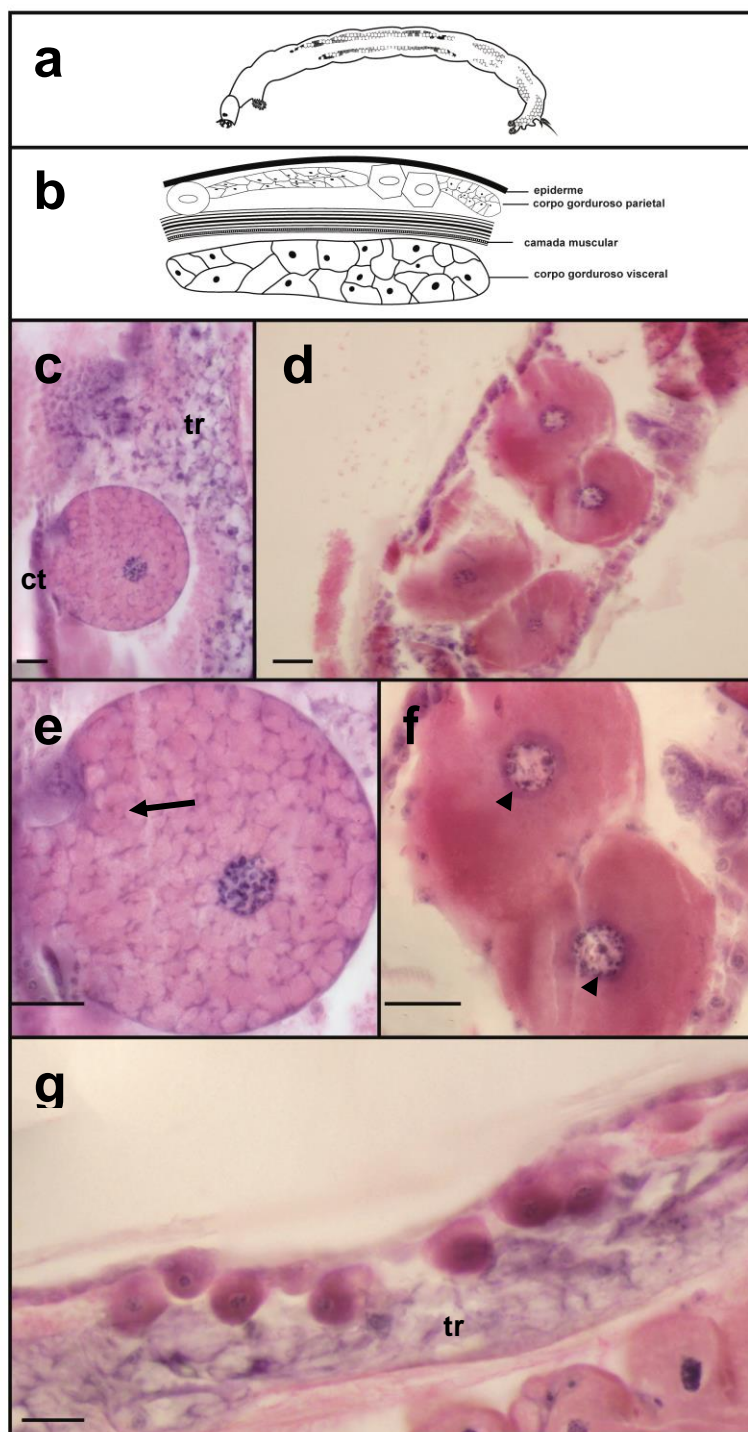


Figura 27: Corpo gorduroso da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do corpo gorduroso na larva. b: esquema dos enócitos no corpo gorduroso c,e: enócito isolado do tipo que apresenta vacúolos em seu citoplasma (setas). d,f: enócitos mais comuns na larva que se apresentam em grupo, notar o citoplasma perinuclear (cabeça de seta). g: enócitos pequenos que se encontram em grandes grupos. ct: cutícula e tr: trofócitos. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

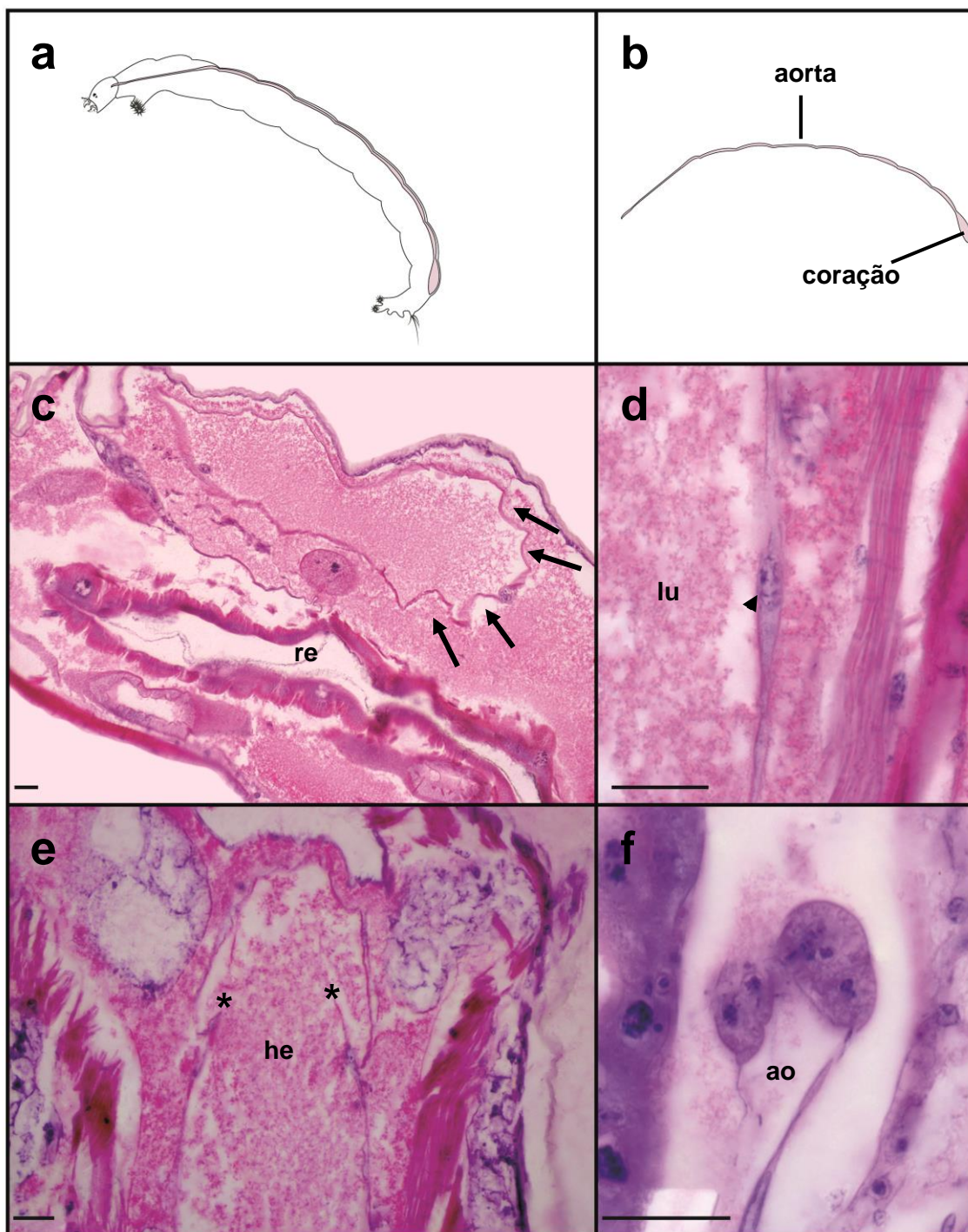


Figura 28: Sistema circulatório da larva de *Chironomus sancticarloi*. a: localização do sistema circulatório na larva, demonstrando coração e aorta. b: em destaque, região tratada nas micrografias. c: corte longitudinal do coração, observar a região dos óstios (setas). d: corte longitudinal da região da parede do vaso dorsal com a célula formadora do vaso (cabeça de seta). e: corte longitudinal da aorta evidenciando as válvulas (*). f: células pericárdicas associadas à parede da aorta. ao: aorta; he: hemolinfa; lu: lúmen da aorta e re: reto. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.

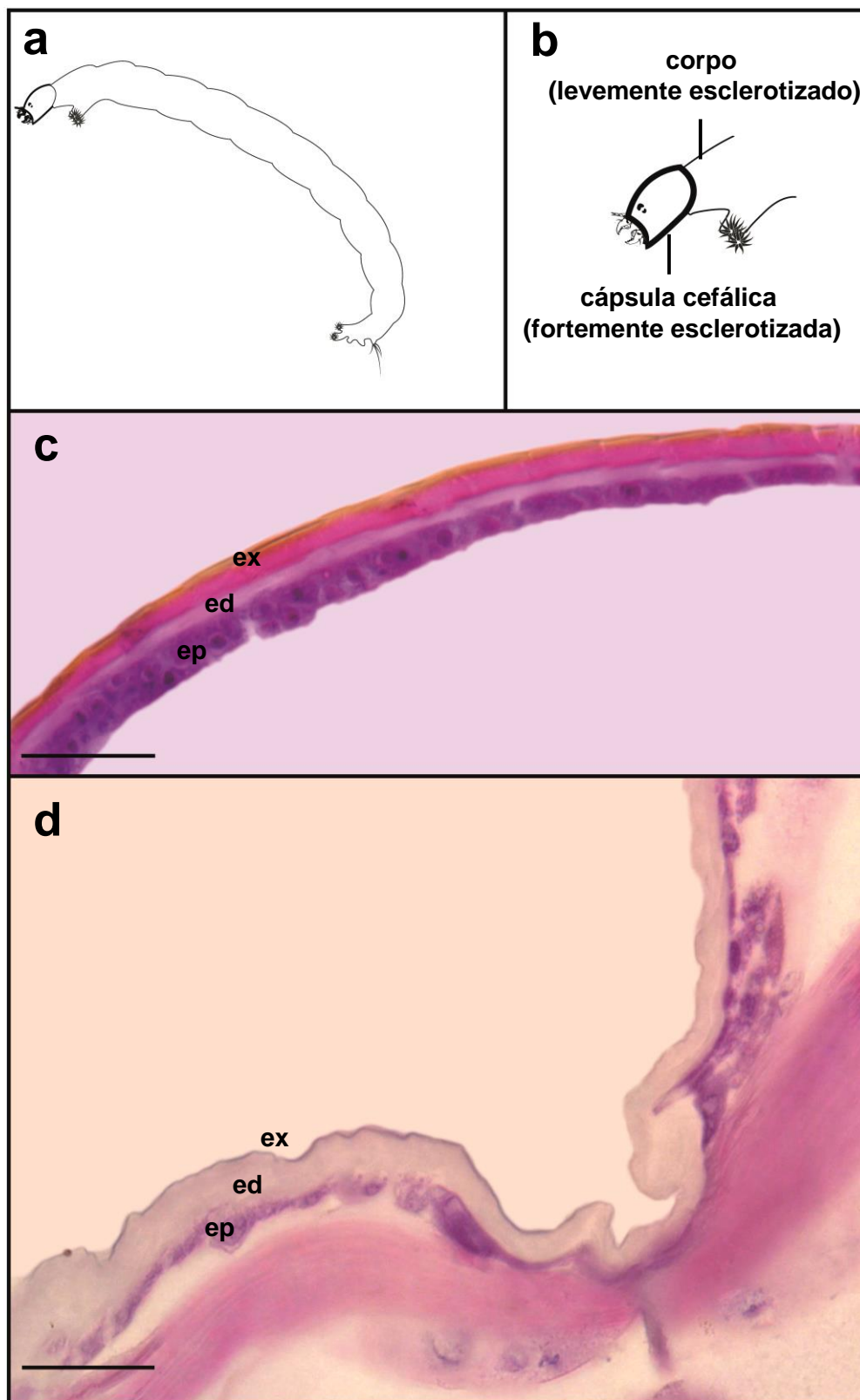


Figura 29: Tegumento da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema tegumentar na larva. b: esquema demonstrando diferentes graus de esclerotização do tegumento. c: corte longitudinal do tegumento da cápsula cefálica, evidenciando o epitélio e a grande quantidade de exocutícula. d: corte longitudinal do tegumento do corpo da larva, verificar a maior quantidade de endocutícula. ed: endocutícula, ep: epiderme e ex: exocutícula. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

5.4 Exposição ao fenantreno

5.4.1 Bioensaios de toxicidade aguda

Nos bioensaios de toxicidade aguda as variáveis físicas e químicas da água monitoradas durante os experimentos mantiveram-se dentro dos padrões em todas as réplicas, a temperatura da água foi de $25^{\circ}\text{C}\pm 2$, o pH variou de 5,6 a 6,2 e a dureza de 30 a 34 mgCaCO_3 . A mortalidade nos controles foi menor que 10% possibilitando a utilização dos testes. Através da análise do material biológico foi possível observar alterações morfológicas no intestino médio, túbulos de Malpighi, células do corpo gorduroso visceral e na glândula salivar (Tabela 5).

No sistema digestório foram observadas alterações apenas no intestino médio. Foi evidenciada redução dos cecos gástricos nas concentrações CL30 e CL50 (Figura 30) e ainda foi detectada na CL50 alteração na região apical da célula de Cuenot, promovendo o rompimento do bordo em escova (Figura 31).

O lúmen da região I do intestino médio apresentou-se mais estreito na CL50 (Figura 30), enquanto na região III também ocorreu o rompimento do bordo em escova nas CL30 e CL50 (Figura 33).

Nos túbulos de Malpighi ocorreu a redução do bordo em escova, apresentando-se menos evidentes em todas as concentrações, exceto na CENO (Figura 34).

No corpo gorduroso foram observadas alterações nucleares, como desfragmentação da cromatina, em todas as concentrações, exceto na CENO (Figura 35).

Em uma única larva da CL50 foi observada, nas células da glândula salivar, uma grande quantidade de vacúolos no citoplasma. Não sendo esta característica evidenciada nas larvas do controle, o referido registro foi considerado uma possível alteração (Figura 36).

Tabela 5: Alterações histológicas observadas em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao hidrocarboneto fenantreno por 96h nos bioensaios de toxicidade aguda nas concentrações CENO, CL2, CL10, CL30 E CL50.

Sistemas	Alterações	Bioensaio de Toxicidade Aguda				
		CENO	CL2	CL10	CL30	CL50
Digestório	Rompimento do bordo em escova região III mesêntero	-	-	-	6/10	10/10
	Lúmen da região I do mesêntero estreita	-	-	-	-	7/10
	Redução dos cecos gástricos	-	-	-	-	10/10
	Rompimento do bordo em escova das Células de Cuénot	-	-	-	-	8/10
Túbulos de Malpighi	Bordo em escova menos evidentes	-	2/10	9/10	8/10	10/10
Corpo Gorduroso	Alterações nucleares nos trofócitos	-	3/10	3/10	3/10	9/10
Glândula Salivar	Vacuolização de células da glândula salivar	-	-	-	-	1/10

5.4.2 Bioensaios de toxicidade crônica

As variáveis físicas e químicas da água monitoradas durante os experimentos mantiveram-se dentro dos padrões em todas as réplicas, a temperatura da água foi de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, o pH variou de 5,8 a 6,7 e a dureza de 30 a 36 mgCaCO_3 .

Nos bioensaios de toxicidade crônica a mortalidade nos controles foi menor que 10%, possibilitando a utilização dos testes.

5.4.2.1 Histologia

Foram observadas alterações histológicas no intestino médio e nas células do corpo gorduroso visceral (Tabela 6).

No sistema digestório a única alteração observada foi o estreitamento da região I do mesêntero em uma única larva, das dez utilizadas na CL50 (Figura 32), enquanto, no corpo gorduroso visceral, em todas as larvas das três concentrações testadas, foram observados coalescência vacuolar no citoplasma das células (Figura 35e).

Tabela 6: Alterações histológicas observadas em larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao hidrocarboneto fenantreno por 8 dias nos bioensaios de toxicidade crônica nas concentrações CENO, CL2 E CL10.

Sistemas	Alterações	Bioensaio de Toxicidade Crônica		
		CENO	CL2	CL10
Digestório	Lúmen da região I do mesêntero estreita	-	-	1/10
Corpo Gorduroso	Alterações nucleares nos trofócitos	-	1/10	-
	Coalescência vacuolar no trofócito	10/10	10/10	10/10

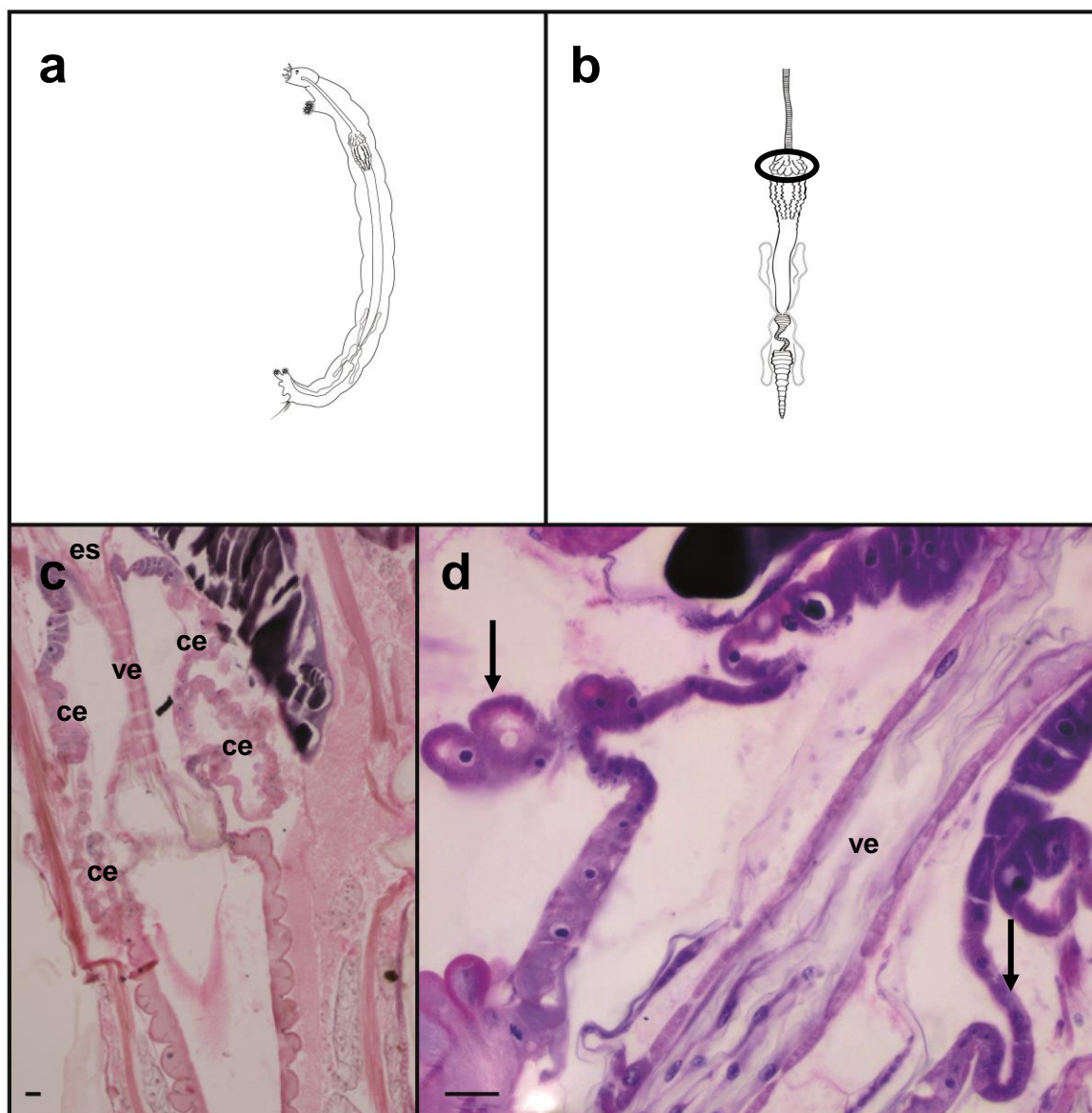


Figura 30: Região dos cecos gástricos da larva de *Chironomus sancticarloi*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: região dos cecos gástricos em larvas do controle, demonstrando a existência de grande quantidade de células em cada ceco. d: região dos cecos gástricos em larvas expostas a CL50 de fenantreno por 96h evidenciando a regressão dos cecos (setas). ce: cecos gástricos; es: esôfago e ve: válvula estomodeal. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

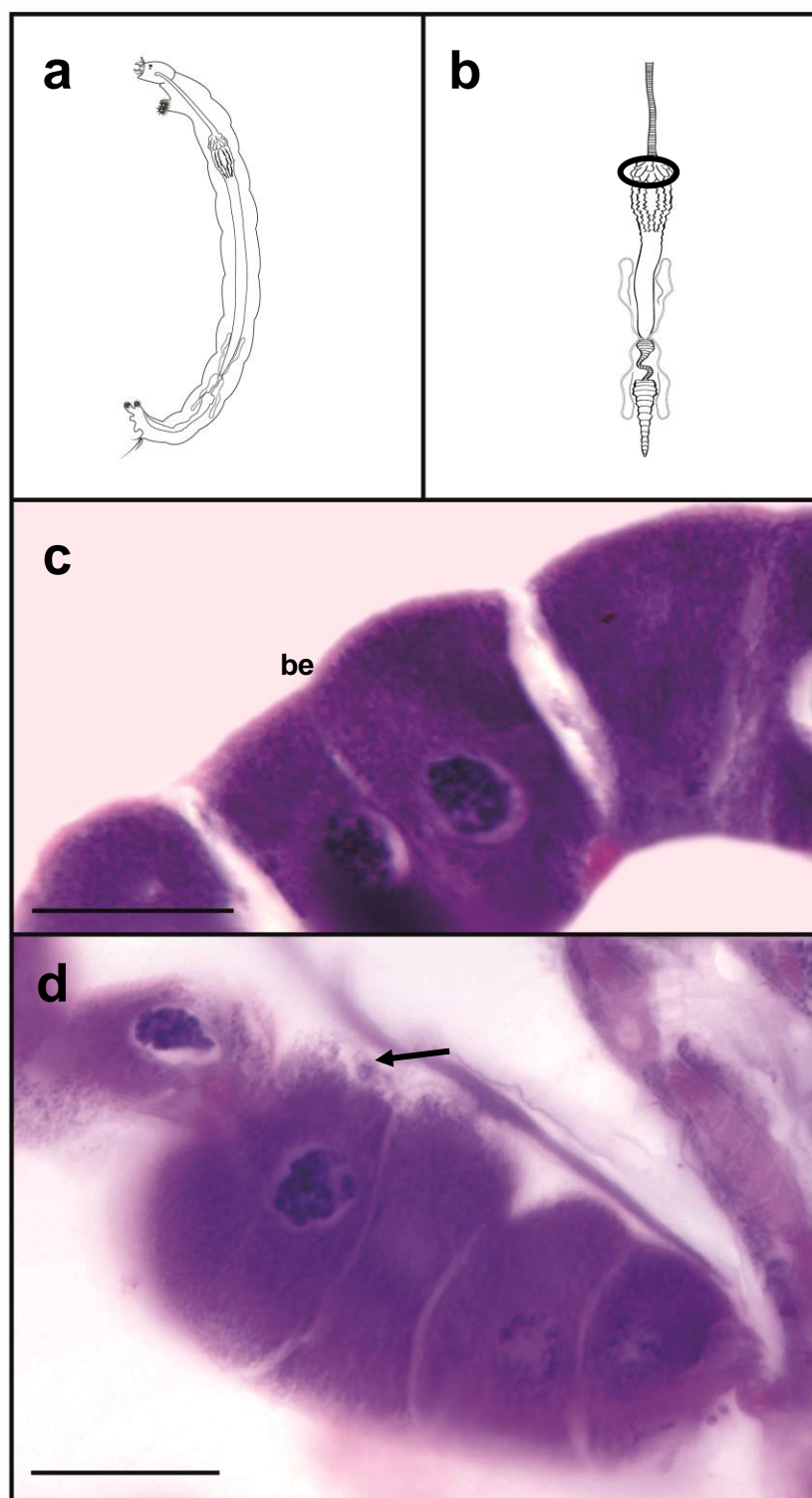


Figura 31: Região da válvula estomodeal da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: células de Cuénót em larvas do controle, demonstrando o bordo em escova formado pelas microvilosidades em condição normal. d: células de Cuénót em larvas expostas a CL50 de fenantreno por 96h evidenciando danos na região apical da célula, como o rompimento do bordo em escova (setas). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

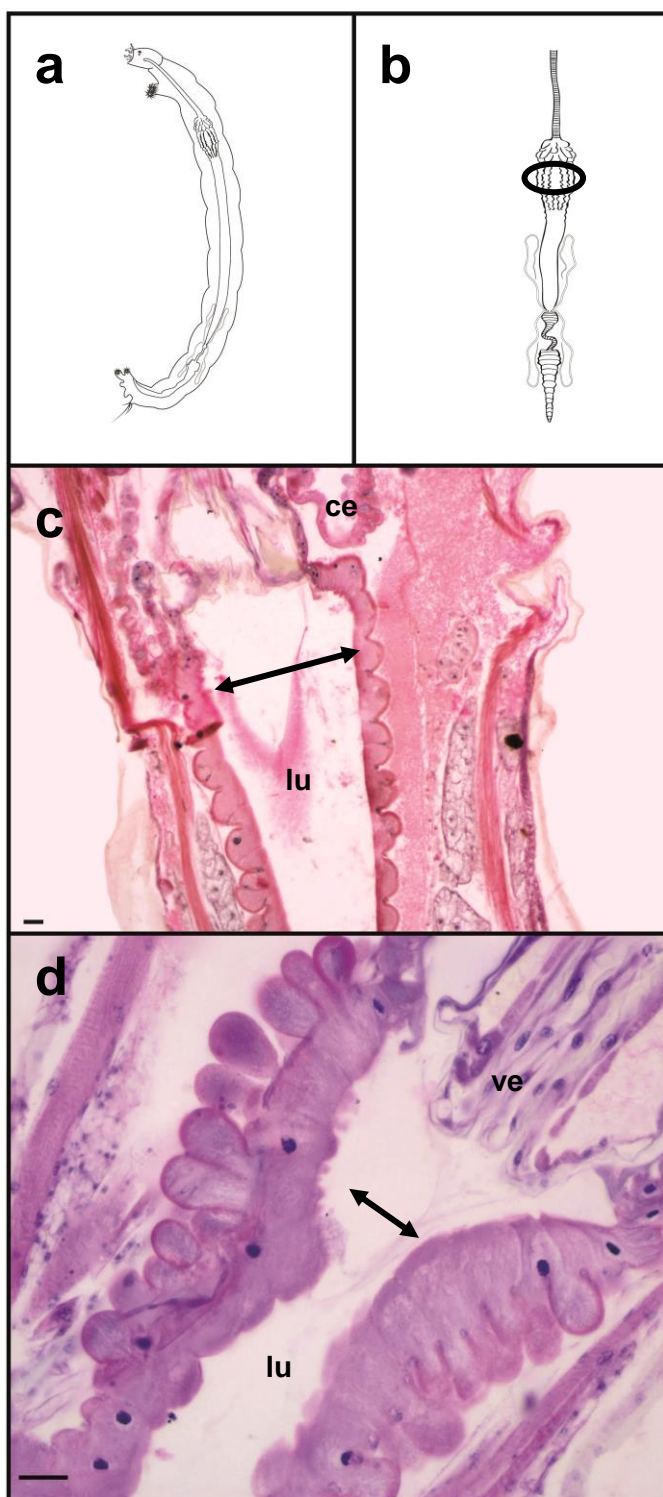


Figura 32: Região I do intestino médio da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: região I do intestino médio em larvas do controle, demonstrando a espessura do lúmen do intestino. d: região I do intestino médio em larvas expostas a CL50 de fenantreno por 96h evidenciando o estreitamento do lúmen do intestino. ce: cecos gástricos; lu: lúmen do intestino e ve: válvula estomodeal. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

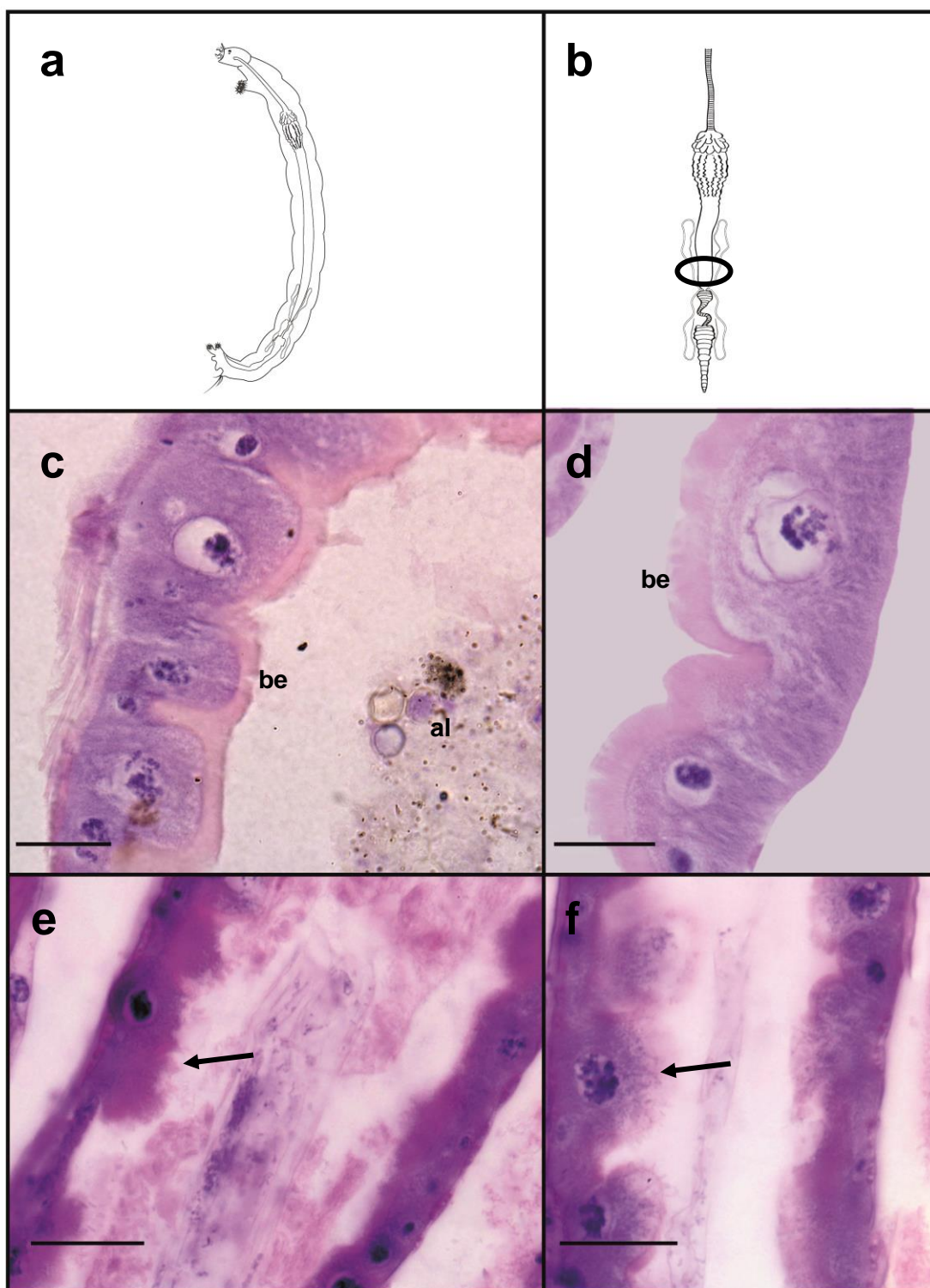


Figura 33: Região III do intestino médio da larva *Chironomus sancticaroli*. a: localização do sistema digestório na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c-d: região III do intestino médio em larvas do controle, demonstrando o bordo em escova formado pelas microvilosidades em condição normal. e-f: região III do intestino médio em larvas expostas a CL50 de fenantreno por 96h evidenciando danos na região apical da célula, como o rompimento do bordo em escova (setas). al: alimento e be: bordo em escova. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.



Figura 34: Túbulos de Malpighi da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização do túbulos de Malpighi na larva. b: em destaque, no círculo, região tratada nas micrografias. c: túbulos de Malpighi em larvas do controle, demonstrando o bordo em escova formado pelas microvilosidades em condição normal. d: túbulos de Malpighi em larvas expostas a CL50 de fenantreno por 96h evidenciando danos na região apical da célula, diminuição do bordo em escova (seta). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 µm.

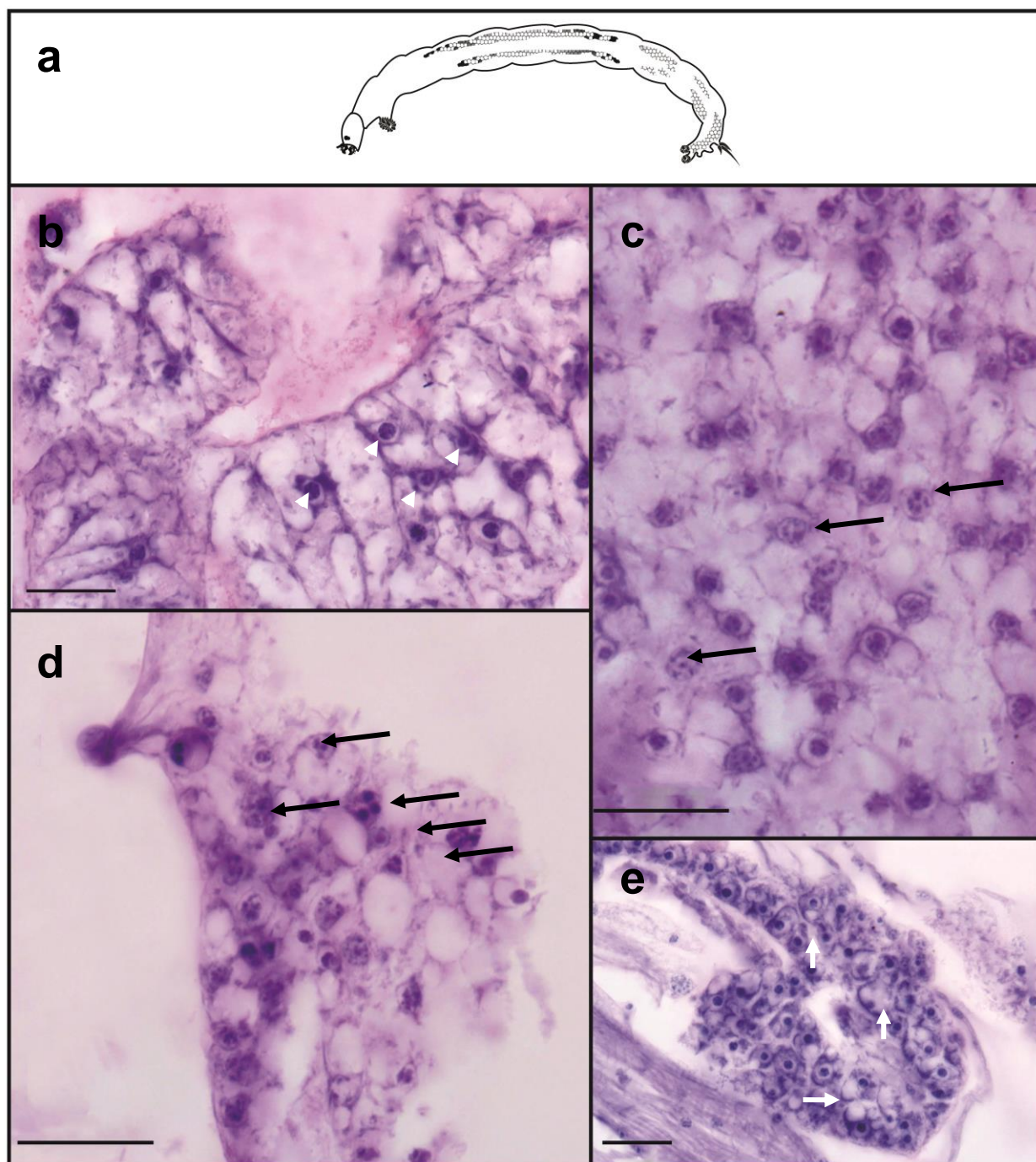


Figura 35: Corpo gorduroso visceral da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: disposição do corpo gorduroso visceral na larva. b: trofócitos do corpo gorduroso visceral de larvas do controle, evidenciando o núcleo celular (cabeça de seta). c-d: trofócitos do corpo gorduroso visceral de larvas expostas a CL50 de fenantreno por 96h, demonstrando as alterações celulares (setas). e: trofócitos do corpo gorduroso visceral de larvas expostas a CL10 de fenantreno por 8 dias, observar a coalescência vacuolar (setas). Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.



Figura 36: Glândula salivar da larva de *Chironomus sancticaroli*. a: localização da glândula salivar na larva. b: esquema da morfologia da glândula. c: corte longitudinal da glândula em larvas do controle, evidenciando o citoplasma homogêneo. d: corte longitudinal da glândula em uma larva exposta a CL50 de fenantreno por 96h, demonstrando a vacuolização do citoplasma (setas). ci: citoplasma homogêneo; nu: núcleo celular e se: secreção. Coloração: Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m.

5.4.2.2 Crescimento larval

5.4.2.2.1 Tamanho do corpo

Na avaliação do tamanho do corpo das larvas, que reflete principalmente o estado nutricional do organismo, evidenciou-se que a média do comprimento diminui com o aumento da concentração do hidrocarboneto fenantreno. Ainda, foi possível observar redução no comprimento mínimo e máximo nas duas maiores concentrações testadas (Tabela 7). Houve diferença significativa, demonstrada pela análise de variância (ANOVA, $p < 0,001$) e o teste *a posteriori* de Tukey, entre os grupos Controle x CENO x CL2 e CL10 (Figura 37).

Tabela 7: Medidas de tendência central e dispersão do corpo da larva de *Chironomus sancticaroli* expostas ao hidrocarboneto fenantreno por 8 dias.

Medidas do corpo (mm)						
Concentração (mg/L)	N. larvas	Min.	Max.	Média	Desvio padrão	Intervalo de confiança
0 (Controle)	30	5,19	17,1	12,75	3,08	11,60 - 13,90
0,12 (CENO)	30	6,43	14,47	10,55	1,78	9,93 - 11,14
0,6 (CL2)	30	3,27	11,49	7,35	1,95	6,62 - 8,09
0,78 (CL10)	30	2,87	12,6	7,19	2,33	6,32 - 8,06

5.4.2.2.2 Tamanho da antena

Na avaliação do tamanho da antena, medida utilizada para estimar o ínstar da larva, evidenciou-se um atraso no desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* nas maiores concentrações de fenantreno (Tabela 8).

Com os resultados obtidos a partir das análises do tamanho do corpo e tamanho da antena, foi possível verificar que o hidrocarboneto fenantreno influenciou no desenvolvimento larval, tanto em relação ao tamanho do corpo como no processo de ecdise (Tabela 9).

Tabela 8: Número de larvas observadas em cada ínstar e sua porcentagem nas três concentrações de fenantreno e controle.

Ínstar	Controle		CENO		CL2		CL10	
	Valor absoluto	Porcentagem	Valor absoluto	Porcentagem	Valor absoluto	Porcentagem	Valor absoluto	Porcentagem
4º	30	100	30	100	18	60	12	40
3º	0	0	0	0	11	36,7	17	56,7
2º	0	0	0	0	1	3,3	1	3,3

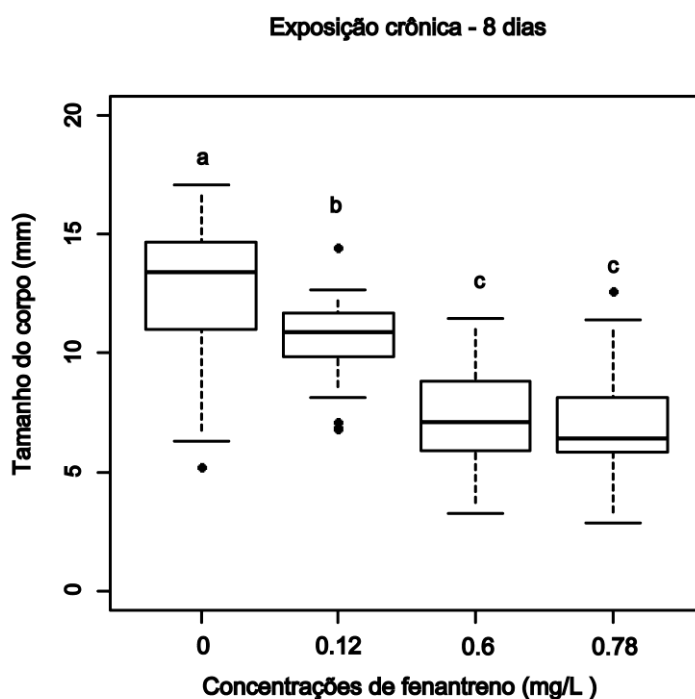


Figura 37: Boxplots das concentrações de fenantreno pelo tamanho do corpo, demonstrando as medidas de tendência central e dispersão, letras diferentes indicam diferenças significativas com $p < 0.001$ (ANOVA-um fator seguido de teste de Tukey *a posteriori*).

Tabela 9: Medidas absolutas do corpo e antenas de larvas de *Chironomus sancticaroli* expostas ao hidrocarboneto fenantreno por 8 dias.

Morfometria de larvas do bioensaio de toxicidade crônica (mm)												
Nº larva	Controle			Ceno			CL2			CL10		
	Ínstar	Antena	Corpo	Ínstar	Antena	Corpo	Ínstar	Antena	Corpo	Ínstar	Antena	Corpo
1	4º	0,16	9,93	4º	0,15	9,84	4º	0,18	6,49	3º	0,08	5,49
2	4º	0,16	10,53	4º	0,20	8,13	3º	0,11	6,48	3º	0,10	5,33
3	4º	0,13	11,93	4º	0,16	10,89	3º	0,09	6,21	3º	0,10	5,55
4	4º	0,15	10,98	4º	0,19	10,94	4º	0,16	6,69	3º	0,10	5,56
5	4º	0,16	5,19	4º	0,13	12,67	3º	0,10	5,56	3º	0,10	6,19
6	4º	0,14	11,37	4º	0,14	11,43	2º	0,06	3,27	4º	0,13	5,95
7	4º	0,16	8,75	4º	0,16	8,69	3º	0,11	5,70	3º	0,09	5,87
8	4º	0,17	6,35	4º	0,14	11,67	3º	0,10	5,60	3º	0,10	4,37
9	4º	0,15	6,32	4º	0,15	11,91	3º	0,10	5,41	3º	0,10	6,83
10	4º	0,17	10,96	4º	0,18	10,01	3º	0,10	5,90	4º	0,18	11,12
11	4º	0,16	13,33	4º	0,14	9,87	4º	0,18	9,12	4º	0,13	10,90
12	4º	0,13	14,66	4º	0,17	10,88	4º	0,19	10,21	2º	0,06	2,87
13	4º	0,17	15,10	4º	0,19	12,63	4º	0,14	8,63	3º	0,10	6,36
14	4º	0,18	14,57	4º	0,17	6,83	3º	0,09	6,62	3º	0,10	6,53
15	4º	0,16	16,39	4º	0,15	10,07	4º	0,15	7,53	3º	0,09	5,81
16	4º	0,12	14,06	4º	0,16	12,36	4º	0,13	11,49	3º	0,09	6,78
17	4º	0,14	13,47	4º	0,16	7,11	4º	0,14	8,23	3º	0,10	6,36
18	4º	0,17	13,33	4º	0,16	10,89	4º	0,13	10,05	4º	0,16	6,28
19	4º	0,17	12,95	4º	0,14	11,76	4º	0,16	6,26	3º	0,09	6,70
20	4º	0,14	12,98	4º	0,18	11,47	3º	0,11	3,84	4º	0,16	8,14
21	4º	0,16	13,48	4º	0,18	10,00	3º	0,09	5,90	4º	0,17	6,60
22	4º	0,17	14,12	4º	0,14	10,94	4º	0,14	7,77	4º	0,18	10,44
23	4º	0,19	12,27	4º	0,16	9,87	3º	0,09	6,03	4º	0,12	11,37
24	4º	0,16	14,13	4º	0,19	12,49	4º	0,16	7,48	4º	0,20	10,91
25	4º	0,14	15,34	4º	0,13	9,05	4º	0,19	8,46	4º	0,19	12,60
26	4º	0,17	16,30	4º	0,17	9,85	4º	0,14	9,18	3º	0,10	6,43
27	4º	0,18	14,45	4º	0,18	6,84	4º	0,18	7,97	4º	0,15	8,99
28	4º	0,14	16,78	4º	0,14	11,67	4º	0,13	8,84	4º	0,17	7,66
29	4º	0,16	15,40	4º	0,15	11,35	4º	0,18	10,25	3º	0,10	6,20
30	4º	0,18	17,10	4º	0,15	14,47	4º	0,15	9,35	3º	0,10	5,40

6. DISCUSSÃO

A grande maioria dos trabalhos histológicos com organismos da família Chironomidae foi realizada no final do século XIX e na primeira metade do século XX. Um dos trabalhos pioneiros foi o de Miall & Hammond (1900), que realizaram uma descrição da fisiologia e histologia de praticamente todos os órgãos da larva e do adulto de *Chironomus dorsalis* Meigen, 1818, onde os autores apresentam ilustrações e descrições detalhadas, até do núcleo celular, mesmo sem que na época se tivesse conhecimento sobre o DNA. Entretanto, este foi o único trabalho que reuniu material completo de uma espécie de Chironomidae, os outros trabalhos publicados apresentam apenas descrições de alguns sistemas isolados.

Os primeiros trabalhos relativos ao aparelho digestório de Chironomidae remontam aos anos de 1900, com o estudo de Vignon (1901) sobre o epitélio e o memorando de Miall & Hammond sobre *Chironomus dorsalis*. Aubertot (1934), em sua monografia sobre as membranas peritróficas dos insetos, dedicou um capítulo às larvas de Chironomidae. Possompès (1938) aborda alguns aspectos do tubo digestivo durante a metamorfose, Gouin (1946) estuda a morfologia do mesêntero e proctodeu nas larvas e Pierson (1956) fez uma descrição sobre todo o sistema digestório de *Chironomus plumosus* Linnaeus, 1758. Em todos os estudos acima referidos foram apresentados apenas ilustrações esquemáticas realizadas a nanquim. Utilizando do avanço tecnológico, Seidman *et al.*, (1986) apresentam micrografias do intestino médio de *Chironomus thummi* (Kieffer, 1911); Jarial (1995) utilizou a microscopia eletrônica na descrição das papilas anais de *Chironomus tentans* Fabricius 1805; Jarial & Engstrom (1997) descrevem a região dos cecos gástricos onde é produzida a matriz peritrófica em *Chironomus tentans* e mais recentemente Nardi *et al.* (2009) fez uma descrição estrutural e ultraestrutural do canal alimentar da espécie antártica *Belgica antarctica* Jacobs, 1900. Assim, ao longo do tempo, é possível observar um refinamento e detalhamento nas descrições morfofuncionais de células e tecidos que compõe distintos órgãos e estruturas.

A descrição histológica do esôfago permite inferir que, sendo um tubo muscular, esteja relacionado com o transporte do alimento através de movimentos peristálticos, entretanto, a ausência de papo, provavelmente atribua ao esôfago a função de digestão mecânica do alimento ingerido pela larva de *Chironomus sancticaroli*. Nossos resultados corroboram as características celulares descritas por Miall & Hammond (1900) e Pierson (1956), para outras espécies de Chironomidae.

O intestino médio é um órgão dinâmico onde ocorre o transporte de íons, de nutrientes e de água para hemolinfa, além da eliminação de fezes e realização de estocagem intraepitelial de substâncias de reserva. Na válvula estomodeal, que impede o refluxo de alimento para o esôfago, encontram-se as células de Cuénot (Pierson, 1956) ou células da cárdia (Jarial & Engstrom, 1997) que são responsáveis pela produção da matriz peritrófica. O citoplasma destas células apresenta basofilia em toda sua extensão, que provavelmente está associada à grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi e ribossomos livres que foram observados por Jarial & Engstrom (1997) na ultraestrutura destas células em outra espécie de Chironomidae, evidenciando sua função secretora. Segundo Wigglesworth (1972) este tipo de membrana peritrófica produzido por um conjunto específico de células é bem comum em Diptera, pois em outros grupos de insetos como abelhas, ela é secretada pela parede do intestino médio. No presente estudo foi detectada estriações no citoplasma das células de Cuénot, as quais possivelmente, segundo Jarial & Engstrom (1997), correspondem a invaginações da membrana basal que, provavelmente, estão relacionadas no transporte de substâncias da hemolinfa para o epitélio para serem utilizadas na síntese da matriz peritrófica. As invaginações da membrana basal não estão associadas com a localização de mitocôndrias, pois estas, de acordo com Seidman *et al.* (1986), encontram-se na região apical das células.

Os cecos gástricos seriam uma região de absorção e processos finais da digestão em muitos insetos (Chapman, 2012). A histologia destas estruturas em *C. sancticaroli* é semelhante à observada em *C. thummi* (Seidman *et al.*, 1986). De acordo com este autor, os cecos gástricos de *C. thummi* são morfologicamente semelhantes às glândulas salivares de *Calliphora*

erythrocephala (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae), ambos tecidos possuem grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e ribossomos livres. Estes dados sugerem que os cecos gástricos em Chironomidae podem ter função de síntese e secreção. Pierson (1956) em seus estudos histoquímicos afirma que mesmo possuindo bordo em escova, essas células não realizam absorção devido a ausência da enzima fosfatase alcalina, envolvida neste processo.

A divisão do intestino médio em três porções deu-se em decorrência dos tipos celulares e suas respectivas funções. Na região I do intestino médio, a eosinofilia descrita no citoplasma basal provavelmente está intimamente relacionada com profundas invaginações da membrana associadas a mitocôndrias e a eosinofilia do citoplasma apical também está associada a mitocôndrias encontradas abaixo das microvilosidades (Seidman *et al.* 1986), característico de células que estão envolvidas no transporte ativo de íons e fluídos. Através de estudos histoquímicos, Pierson (1956) e Seidman *et al.* (1986) concluíram que esta região não realiza absorção de nutrientes, pois o fluxo nestas células ocorre do citoplasma para o lúmen do intestino, sugerindo atividade secretora.

Na região II do intestino médio, a área basal do citoplasma corada heterogeneamente detectada neste estudo, de acordo Seidman *et al.* (1986), corresponde a uma grande quantidade de invaginações da membrana basal, porém com menor quantidade de mitocôndrias associadas, quando comparada a região I. Nestas células foi observado um bordo em escova relativamente conspicuo, o que corrobora com o observado por Pierson (1956) que afirma que estas células estejam realizando a função de absorção de nutrientes, pois este autor observou atividade da enzima fosfatase alcalina que está relacionada com esta função. Seidman *et al.* (1986) afirmam ainda que estas células, teriam função de síntese proteica e reserva de glicogênio.

A região III corresponde a principal região de absorção do intestino médio, apresenta extensas microvilosidades, o que corrobora com as características desta região apontada por Pierson (1956), além da alta atividade fosfatásica nesta região. No citoplasma basal destas células foi possível observar como na região II, áreas não coradas que de acordo com

Seidman *et al.* (1986) são invaginações da membrana, mas não com muitas mitocôndrias associadas como na região anterior.

A basofilia citoplasmática observada nas células da região II e III do intestino médio está relacionada de acordo com Seidman *et al.* (1986) com a presença de grande quantidade de organelas envolvidas na síntese proteica como retículo endoplasmático rugoso e ribossomos livres.

A válvula proctodeal tem como função impedir o refluxo de conteúdo do intestino posterior para o médio, as células que compõem a região valvular parecem não ter nenhuma função específica, porém segundo Pierson (1956) esta seria a região com maior quantidade de glicogênio no sistema digestório de larvas de Chironomidae.

O íleo apresenta parede fortemente muscular o que provavelmente evidencia que esta estrutura desempenha papel mecânico no peristaltismo. O colón e reto apresentaram a mesma constituição celular, apresentando células com citoplasma basófilo e região basal da célula eosinófila. Segundo Pierson (1956) esta seção do proctodeu teria como função realizar a reabsorção de água.

As glândulas salivares de espécies de Chironomidae serviram como objeto de vários estudos celulares (Miall & Hammond 1900; Jacob & Sirlin, 1964; Jacob & Jurand, 1965). Segundo Jacob & Jurand (1965), na análise ultraestrutural das células das glândulas salivares de *Smittia parthenogenetica*, foi possível observar bordo em escova, porém, no presente estudo, assim como no descrito por Miall & Hammond (1900), as mesmas células, analisadas em *Chironomus sancticaroli*, não apresentaram esta característica por meio da análise em microscopia de luz. A diferença encontrada em relação à presença ou não do bordo em escova pode estar associada a filogenia, uma vez que as espécies pertencem a subfamílias distintas. O citoplasma da célula apresenta forte basofilia, provavelmente devido a grande quantidade de organelas envolvidas no processo de síntese, já que estas células apresentam alta transcrição devido a presença de cromossomos politênicos. Segundo Miall & Hammond (1900) e Pierson (1956) a glândula salivar tem como função produzir os fios de seda utilizados na confecção do tubo de proteção da larva e não está relacionada com funções digestivas, talvez fosse adequado que esta glândula

receba a denominação de glândula de seda, pois as funções digestivas são realizadas por células do sistema digestório, talvez os cecos gástricos que se assemelharam às glândulas salivares de moscas.

No presente estudo as análises histológicas dos túbulos de Malpighi identificaram um único tipo celular, entretanto, o trabalho de ultraestrutura realizado por Jarial (1988) detectou um segundo tipo celular que aparece em menor frequência sendo denominada de célula estrelada. Pelo fato de Jarial (1988) ter analisado os túbulos de Malpighi de uma espécie congênere àquela analisada neste estudo, acredita-se que a não detecção do outro tipo celular pode ter ocorrido pela diferença do poder de resolução entre a microscopia de luz e a eletrônica.

As células primárias dos túbulos de Malpighi de *C. sancticaroli*, apresentaram eosinofilia basal, de acordo com Jarial (1988) em uma espécie congênere, nesta região a membrana plasmática basal forma uma série de invaginações associadas à mitocôndrias, indicando sua função no transporte ativo de íons. No presente estudo foi possível observar um sutil bordo em escova e de fácil observação, porém estes não estariam relacionados à absorção ou transporte ativo de substâncias, pois Jarial (1988) verificou que não existem mitocôndrias nesta região. Nas células pericárdicas foram observadas granulações no citoplasma que provavelmente são depósitos de algum metabólito secundário. De acordo com Miall & Hammond (1900) este tipo celular elimina carminato de amônia do organismo da larva.

A anatomia do sistema nervoso e o complexo retrocerebral de larvas de Chironomidae foi descrito primeiramente por Miall & Hammond (1900), porém estes autores não apresentaram a histologia deste sistema. A histologia do complexo retrocerebral foi descrita e bem discutida por vários autores (Miall & Hammond, 1900; Holmgren, 1904; Burt, 1937; Zee & Pai, 1944; Possompès, 1946; Possompès, 1948; Kümmel, 1969; Credland & Phillips, 1974; Credland & Scales, 1976 e Panov, 1979), porém somente a partir do trabalho de Possompès (1946) é que as glândulas foram corretamente identificadas com as nomenclaturas apresentadas no presente estudo.

O cérebro na larva de *C. sancticaroli* está localizado no primeiro segmento torácico e não na cabeça como em outras larvas de Diptera, este

deslocamento está associado provavelmente a evento evolutivo que permite maior desenvolvimento dos músculos mandibulares, pois estes preenchem toda a cabeça da larva. De acordo com Miall & Hammond (1900) as larvas de primeiro instar recém-eclodidas apresentam o cérebro na cabeça, mas ao longo da ontogenia este gânglio é deslocado para o tórax, e então no imago o cérebro retorna à cabeça, pois nestes o aparelho bucal é rudimentar não necessitando de mandíbulas fortes devido à ausência de comportamento alimentar em ambos sexos.

As células que compõem as glândulas endócrinas das larvas de *C. sancticaroli* possuem núcleo com eucromatina, característico de células secretoras. Estas estruturas descritas no presente estudo desempenham as mesmas funções que em outros insetos sendo a *corpora cardiaca* responsável pela liberação do hormônio peptídico protorácicotrópico que estimula a atividade secretora das glândulas protorácicas, já a *corpora allata* é responsável pela liberação do hormônio juvenil (terpenóide) regulando a metamorfose, inibindo caracteres do adulto e as glândulas protorácicas liberam o ecdisona ou hormônio da muda (ecdisteróide) que permite o surgimento das características do adulto ou mudança de estágio (Cruz-Landim, 2009). As glândulas póscerebrais anteriores observadas no presente estudo, possuem estrutura muito semelhante às células pericárdicas, o que corrobora com os dados encontrados por Cazal (1948) que afirma que estas glândulas são uma estrutura única de Chironomidae sendo homólogas às células pericárdicas encontradas no complexo retrocerebral de Culicidae, desempenhando papel de nefrócitos.

Em relação ao corpo gorduroso, os enóctios foram descritos apenas por Miall & Hammond (1900) como células associadas à epiderme das larvas, em relação aos trofócitos, alguns trabalhos relatam seu papel na produção de hemoglobina e descrevem sua ultraestrutura (Schin *et al*, 1977; Vafopoulou-Mandalos & Laufer, 1984). Nos trofócitos foi possível observar a presença de citoplasma basófilo perinuclear, que de acordo com Schin *et al*. (1977) nesta região da célula existe uma grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso. Os trofócitos do corpo gorduroso visceral atuam no metabolismo energético das larvas e provavelmente nos processo de desintoxicação (Cruz-

Landim, 2009), em Diptera (*Anopheles* e *Drosophila*), os enócitos expressam a enzima NADH citocromo redutase-P450 (Lycett *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2009), envolvida no processo de desintoxificação. Vafopoulou-Mandalos & Laufer (1984), afirmam que nos enócitos existe uma grande quantidade de hemoglobina, porém não seriam estas células as produtoras desta globina, e de acordo com Schin *et al.* (1977) o principal local de síntese é nos trofócitos do corpo gorduroso parietal, onde a hemoglobina sintetizada, é transportada para outras regiões da larva.

No citoplasma dos enócitos do tipo isolado foi observada uma grande quantidade de grânulos, que provavelmente são hidrocarbonetos da cutícula (Cruz-Landim, 2009) ou hemoglobina armazenada (Schin *et al.*, 1977), sendo esta última liberadas na hemolinfa. De acordo com Cruz-Landim (2009) estas células em abelhas possuem uma grande quantidade de retículo endoplasmático liso no seu citoplasma e sua função estaria relacionada a síntese de hidrocarbonetos cuticulares ou ecdisteróides. Nos enócitos agrupados de *C. sancticaroli* foi observado citoplasma perinuclear evidente basófilo que provavelmente está associada à presença de organelas envolvidas na síntese proteica, porém a função destas células é incerta.

A morfologia do sistema circulatório foi descrita apenas por Miall & Hammond (1900), sendo o coração uma câmara com parede de contração rítmica, dois pares de óstios laterais por onde a hemolinfa entra para ser bombeada até a cabeça pela aorta, um par de válvulas aórticas que também foram constatadas no presente estudo que impedem o refluxo da hemolinfa no sentido contrário ao da circulação, porém estes autores verificaram seis pares de músculos aliformes, que talvez devido à orientação dos cortes, não foram observados no presente estudo.

O tegumento dessas larvas foi estudado por Miall & Hammond (1900) em sua estrutura simples e a ultraestrutura por Credland (1978). No corpo da larva de *C. sancticaroli* a cutícula é delgada e flexível o que corrobora com o encontrado por Credland (1978) que afirma que a estrutura do tegumento no corpo da larva é condizente com os movimentos fortes que esta realiza durante a natação. A cera presente na epicutícula de outros insetos não está presente

neste organismo, provavelmente por este ser aquático e não ter problemas com a perda de água.

Na tentativa de entender e prevenir a poluição ambiental é de extrema importância detectar os efeitos que diferentes substâncias causam nos organismos aquáticos. O presente estudo fornece a aplicação de biomarcadores histológicos em um organismo amplamente utilizado na avaliação da toxicidade de sedimentos.

Quando a faixa de sensibilidade ao KCl obtida neste estudo (3,26 a 5,58 g/L) é comparada com a faixa encontrada por Fonseca (1997), para a mesma espécie e substância referência, pode-se observar uma similaridade dos dados, já que o valor médio encontrado pela autora para a CL_{50} foi de 4,5 g.L⁻¹ e faixa de sensibilidade de 2,6 a 6,4 g.L⁻¹ (coeficiente de variação (CV) = 21%).

De forma geral, um método ecotoxicológico é considerado bom quando a variação dos resultados, expressa pelo CV, estão entre 8% e 40% (*Environment Canada*, 1990). No presente trabalho o CV obtido foi de 13,08%, portanto, este valor indica que a manutenção da espécie foi realizada em condições uniformes, bem como houve pouca variabilidade nas respostas entre os organismos.

A partir destes resultados pode-se dizer que a população de *C. sancticaroli* mantida no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária pode ser utilizada como organismo teste em bioensaios de toxicidade.

Em relação à exposição ao fenantreno, o tecido que mais apresentou possíveis alterações foram as células do intestino médio, porém não ocorreram alterações no estomodeu e no proctodeu pois segundo Correia *et al.* (2009) estas regiões possuem uma íntima espessa quitinosa que atua como barreira à entrada de substâncias estranhas. As alterações observadas foram no mesêntero, principalmente o rompimento do bordo em escova de células de Cuénot e região III do intestino médio. Nasiruddin & Mordue, (1993) encontraram a mesma alteração em células do intestino médio de gafanhotos expostos à azadirachtina nomeando a alteração como degeneração apical e extrusões citoplasmáticas causadas por mudanças degenerativas no citoplasma da célula. Bouchard & Bouchard-Madrelle (2000) também

observaram degeneração e rompimento do bordo em escova no intestino médio de gafanhotos expostos ao hidrocarboneto benzo(a)pireno. As alterações observadas no ápice das células de Cuénot no presente estudo poderiam ser consideradas efeitos da secreção da matriz peritrófica, porém Jarial & Engstrom (1997) afirmam que estas células se mantêm intactas durante a liberação da secreção, então provavelmente o efeito observado foi causado pelo fenantreno. Scudeler & Santos (2013) afirmam que alterações nas microvilosidades são decorrentes das mudanças nos microfilamentos de actina e que células que passam por estas alterações podem apresentar futuramente necrose se o estímulo nocivo permanecer.

Além disso, foi observado estreitamento do lúmen da região I do mesêntero que pode ter ocorrido por alterações na morfologia e musculatura do tubo digestório como observado em larvas de Lepidoptera por Correia *et al.* (2009), alterações na musculatura talvez podem pressionar o tubo diminuindo o diâmetro da luz. A regressão dos cecos gástricos observada foi também relatada em larvas de mosquito expostas à azadirachtina devido à degeneração das células que compõem os cecos gástricos (Al-Mehmadi & Al-Khalaf, 2010).

As alterações no sistema digestório só foram observadas nas CL30 e CL50, talvez nas outras concentrações não foram observadas alterações devido ao curto tempo de exposição (96 h) e baixa concentração, não sendo tempo e dose suficientes para desenvolver alterações morfológicas.

Nos túbulos de Malpighi foi observado diminuição do bordo em escova, o que corrobora com os dados de Ferreira *et al.*, (2013) que observou a mesma alteração em abelhas adultas expostas ao fipronil e ácido bórico e Bouchard & Bouchard-Madrelle (2000) em gafanhotos expostos ao hidrocarboneto benzo(a)pireno. Porém é incerto se este é um efeito direto do xenobiótico ou um efeito indireto, pois de acordo com Jarial (1988) a morfologia dos túbulos de Malpighi em Chironomidae é altamente dependente de algumas condições fisiológicas, larvas alimentadas apresentam bordo em escova maior do que larvas não alimentadas onde as microvilosidades parecem diminuir muito. Duas hipóteses podem ser levantadas, o hidrocarboneto fenantreno alterou a região de absorção de nutrientes do intestino médio e talvez essas larvas absorveram

menos nutrientes e por isso a morfologia do túbulo foi alterada ou realmente o processo de excreção dos metabólitos deste composto danificou o bordo em escova do túbulo.

O corpo gorduroso de todas as concentrações exceto a CENO apresentaram alterações nucleares que podem ser indícios de mudança de atividade, ou seja, aumento da expressão de genes de desintoxicação ou estas alterações são indícios de atraso da ativação do processo degenerativo fisiológico pré-matamórfico relacionado com o aumento do título de ecdisona ao longo do quarto ínstar. De acordo com Bouchard & Bouchard-Madrelle (2000) em gafanhotos expostos a hidrocarboneto, o corpo gorduroso apresentou células com núcleos picnóticos, células mortas e infiltração de hemócitos, segundo estes autores este seria o órgão de desintoxicação nos insetos, porém nem sempre conseguem eliminar todo o composto e por isso acaba ocorrendo morte de algumas células.

Tanto no corpo gorduroso como nos túbulos de Malpighi estas alterações ocorreram mesmo em baixas concentrações e em pouco tempo de exposição, talvez seriam órgãos mais sensíveis que o tubo digestório para expressar patologias teciduais. Além disso, as alterações se apresentaram dose-dependentes, ou seja, apareceram mais alterações conforme foi aumentando a concentração de fenantreno, como é esperado para um bom biomarcador (Amorim, 2003), este dado salienta que a histologia pode ser considerada um biomarcador em estudos de ecotoxicologia aquática em Chironomidae.

Diferentemente do controle, em apenas uma larva da CL50 foi observado vacuolização do citoplasma. Esta estrutura sofre degeneração quando a larva entra no estágio de pupa, talvez houve um adiantamento neste processo neste organismo, na tentativa de acelerar o ciclo para evitar este ambiente contaminado.

Nos bioensaios de toxicidade crônica, esperava-se maiores alterações histopatológicas devido ao tempo de exposição, porém este fato não foi observado. A única alteração conspícua foi a coalescência de vácuolos no citoplasma dos trofócitos do corpo gorduroso visceral em todas as concentrações, esta alteração também foi encontrada por Ferreira (2010) em

abelhas expostas ao fipronil e ácido bórico. Hakim *et al.* (2010) afirmam que durante a metamorfose mesmo estruturas não esclerotizadas também podem ser renovadas, como o corpo gorduroso e o mesêntero, por isso provavelmente a cada muda estes tecidos, juntamente com os túbulos de Malpighi, eram renovados, sendo talvez um mecanismo de reparo de patologias teciduais nesses organismos. Talvez se tivessem sido realizadas amostragens ao longo dos bioensaios de toxicidade crônica para avaliação histológica, alterações teciduais mais severas teriam sido detectadas.

Em relação ao desenvolvimento larval, a partir da CENO foi possível observar efeitos no tamanho do corpo, porém nesta concentração não houve efeito no ínstar da larva e não foram observadas alterações histológicas visíveis à microscopia óptica no sistema digestório, porém provavelmente efeitos não detectáveis no bordo em escova da região III do intestino médio devem ocorrer promovendo menor absorção de nutrientes por esses organismos. A influência no tamanho do corpo foi maior ainda nas CL2 e CL10 e efeitos no ínstar das larvas foram nítidos, demonstrando que existe uma influência do fenantreno na muda. De acordo com Nasiruddin & Mordue (1993), efeitos no sistema digestório diminuem a absorção de nutrientes o que consequentemente reflete no estado nutricional da larva, além disso, as larvas provavelmente investiram muita energia produzindo enzimas na tentativa de detoxificar seu organismo e este gasto energético também pode ser refletido como menor tamanho do corpo. Oliveira *et al.* (2007) afirmam que o hidrocarboneto fenantreno alterou a função endócrina em peixes, atuando como análogo de esteroides, então como o ecdisona é formado por esteróides, talvez este xenobiótico tenha causado disrupção endócrina em *C. sancticaroli*, influenciando nos processos da muda.

O fenantreno apresenta alta toxicidade a vários organismos aquáticos, Wu *et al.* 2007 verificaram histopatologias nas brânquias e fígado de uma espécie de peixe expostos por 36 dias nas concentrações de 0,00005 mg/L e 0,1 mg/L. Essas patologias consistiam em hipertrofia e edema no epitélio de revestimento branquial e hipertrofia, vacuolização, necrose e alterações nucleares nos hepatócitos. No presente estudo na concentração CENO (0,12 mg/L) nos bioensaios de toxicidade crônica também foram observados

alterações nucleares, talvez alterações mais severas não ocorreram ou devido ao processo de reparação tecidual citado anteriormente, ou devido a presença do sedimento que pode se ligar ao hidrocarboneto, tornando-o menos biodisponível.

A diminuição do crescimento larval pode ter sido causada ou por menor absorção de nutrientes ou por alteração no comportamento alimentar, pois segundo Lotufo & Fleeger (1996) um oligoqueta exposto ao fenantreno ingeriu menor quantidade de alimento. Além disso, estes autores observaram que este oligoqueta evita se enterrar em sedimentos contaminados com o fenantreno. De acordo com CETESB (2011) os sedimentos de rios no estado de São Paulo estão altamente contaminados com este xenobiótico, se nos ambientes naturais as larvas de Chironomidae possuem este mesmo comportamento frente ao fenantreno, estarão mais susceptíveis à predação, o que pode a longo prazo levar a diminuição das populações destes indivíduos.

A USEPA em 1993 realizou um estudo sobre a sensibilidade de organismos aquáticos, como invertebrados, crustáceos, insetos e peixes, ao fenantreno e verificou que a CL50 variou de 0,1 mg/L a 1,15 mg/L. Neste estudo *Chironomus tentans* apresentou CL50 de 0,5 mg/L. A espécie *C. sancticaroli* mostrou-se mais tolerante a este xenobiótico (CL50 foi de 1,2 mg/L) este fato pode ser explicado por diversos fatores isolados ou combinados: como natureza química do produto; hábitos de vida e as características do metabolismo de cada espécie. A toxicidade é considerada espécie-específica para cada produto e ela é determinada principalmente pela capacidade de uma espécie em metabolizar o composto de origem em formas mais ou menos tóxicas, e pela suscetibilidade do sítio alvo ao qual o agente tóxico irá agir (Keizer *et al.*, 1995). Além disso, a diferença da sensibilidade principalmente das duas espécies de Chironomidae comparadas pode ser explicada pelos diferentes métodos utilizados nos bioensaios pois de acordo com Knie & Lopes (2004) fatores como pH e dureza podem alterar a toxicidade de xenobióticos.

Halpern *et al.* (2002) verificaram que larvas da espécie *Chironomus luridus* Strenzke, 1959 submetidas a exposição ao cobre apresentaram menor mortalidade quando estavam dentro dos tubos em comparação com larvas expostas as mesmas condições, porém sem tubos. Portanto, o hábito

bentônico somado a produção de tubos na espécie *C. sancticaroli* pode proporcionar essa diferença de sensibilidade entre as espécies.

Provavelmente o hidrocarboneto fenantreno entrou no organismo via oral, Varanasi *et al.* (1989) afirmam que organismos aquáticos absorvem HPAs por ingestão, estes compostos então alcançam o sistema digestório e no intestino médio onde não existe a barreira cuticular atravessam as membranas. De acordo com Billiard *et al.* (2002) estes compostos atravessam facilmente as membranas lipídicas devido à sua lipofilicidade causando talvez danos nessas células, alcançando então a hemocele, podendo ter sua concentração reduzida principalmente através da ação de enzimas produzidas no corpo gorduroso e excreção pelo túbulos de Malpighi. Porém patologias podem ocorrer nesses órgão devido a alta atividade e altas concentrações do xenobiótico. Consequentemente a estes eventos a homeostase do organismo é perdida e isso pode ser percebida pelo atraso no desenvolvimento e diminuição do tamanho do corpo da larva. De acordo com Sibley *et. al.* (1997) efeitos no crescimento possuem uma significância ecológica na reprodução e dinâmicas populacionais de Chironomidae.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A descrição da histologia completa da larva possibilita que futuros estudos resgatem esta ferramenta como biomarcador nestes organismos amplamente utilizados na ecotoxicologia;
- Como a glândula salivar parece não estar envolvida na secreção de enzimas digestivas, mas na produção de seda, seria adequado renomeá-la como glândula de seda;
- A histologia mostrou-se sensível quando o organismo estava exposto ao xenobiótico, demonstrando sua aplicação como biomarcador para Chironomidae, apresentando um efeito dose-dependente;
- O fenantreno atuou como desregulador no crescimento das larvas e como está presente em grandes quantidades em sedimentos naturais pode gerar riscos populacionais a longo prazo;
- O sistema digestório nas altas concentrações e no corpo gorduroso e túbulos de Malpighi até nas menores concentrações foram os mais sensíveis ao fenantreno, e como foi apresentada a descrição histológica destes sistemas, estes órgãos podem ser utilizados em avaliações rápidas não necessitando de avaliação de toda a larva;
- Apesar do fenantreno não ter causado alterações em todos os órgãos da larva, a descrição destes é importante, pois outros compostos podem agir em outros sítios alvo nestes organismos.

REFERÊNCIAS

Adams, W.J. & Rowland, C.D. (2003). Aquatic toxicology test methods. In: *Handbook of ecotoxicology*. Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A. & Cairns, J. (Eds), pp 18-39. Boca Raton, FL: CRC.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1995). *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons*. U.S. Public Health Service.

Al-Mehmadi, R.M. & Al-Khalaf, A.A. (2010). Larvicidal and histological effects of *Melia azedarach* extract on *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of King Saud University (Science)* **22**, 77-85.

Amorim, L.C.A. (2003). Os biomarcadores e a sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia* **6**, 1-13.

Ankley, G.T., Benoit, D.A., Balogh, J.C., Reynoldson, T.B., Day, K.E. & Hoke, R.A. (1994). Evaluation of potential confounding factors in sediment toxicity tests with three freshwater benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**, 627–635.

Aubertot, M. (1934). *Recherches sur les péritrophiques des Insectes, en particulier des Diptères*, G. Thomas, édit., Nancy.

Azevedo-Pereira, H.M.V.S. & Soares, A.M.V.M. (2010). Effects of mercury on growth, emergence, and behaviour of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **59**, 216–224.

Azevedo-Pereira, H.M.V.S., Lemos, M.F.L. & Soares, A.M.V.M. (2010). Behaviour and growth of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae)

under Imidacloprid pulse and constant exposure scenarios. *Water, Air, Soil Pollution* **219**, 215–224.

Barbosa, D.S. (2008). *Análise da interação entre substâncias húmicas e xenobióticos através de estudos ecotoxicológicos: proposta para a geração de tecnologias de detoxificação aquática*. Tese (Doutorado)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Benincá, C., Ramsdorf, W., Vicari, T., Ribeiro, C.A.O., Almeida, M.I., Assis, H.C.S. & Cestari, M.M. (2012). Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast–Southern of Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment* **184**, 2045-2056.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal Fish Disease* **22**, 24–35.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. & Wahli, T. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal Fish Disease* **22**, 24–35.

Billiard, S.M., Hahn, M.E., Franks, D.G., Peterson, R.E., Bols, N.C. & Hodson, P.V. (2002). Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **133**, 55–68.

Bonani, F. (2010). *Avaliação de deformidades morfológicas em larvas de Chironomus (Diptera, Chironomidae) na bacia do rio Piracicaba e sua aplicação no biomonitoramento*. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Bouchard, J. & Bouchard-Madrelle, C. (2000). Lésions provoquées chez le criquet *Gomphocerus sibiricus* par l'absorption de benzo-a-pyrène et de 3-méthylcholanthrène. *Annales des Sciences Naturelles* **21**, 119-136.

Bramorski, J. (2004). *Avaliação da qualidade de sedimentos dos rios Tietê e Piracicaba nos seus compartimentos de entrada no reservatório de Barra Bonita, SP*. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Burt, E.T. (1938). On the corpora allata of dipterous insects II. *Proceedings of the Royal Society B* **126**, 210–223.

Buss, D.F., Baptista, D.F. & Nessimian, J. L. (2003). Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Caderno de Saúde Pública* **19**, 465-473.

Cairns, J. & Pratt, J. R. (1993). A history of biological monitoring using benthic Macroinvertebrates. In: *Freshwater Biology and Benthic Macroinvertebrates*, Rosenberg, D.M. & Resh, V.H., (Eds.), pp 10-17. Chapman & Hall, New York.

Callaghan, A., Fisher, T.C., Grosso, A., Holloway, G.J. & Callaghan M. (2002). Effect of temperature and pirimiphos methyl on biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **52**, 128–133.

Callaghan, A., Hirthe, G., Fisher, T. & Crane, M. (2001). Effect of short-term exposure to chlorpyrifos on developmental parameters and biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **50**, 19–24.

Canadian Council of Ministers of the Environment. (1999). *Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life-Protocol for the Derivation*

of Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Ontario: CCME. (EPC-98E).

Cazal, P. (1948). Les glandes endocrines rétro-cérébrales des Insects. (Etude morphologique). *Bulletin biologique de la France et de la Belgique Supplement* **32**, 1-227.

Chung, H., Sztal, T., Pasricha, S., Sridhar, M., Batterham, P. & Dalborn, P. (2009). Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 5731-5736.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB. (2011). *Qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo.*

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. (2005). *Lista holandesa de valores de qualidade do solo e da água subterrânea – Valores STI.* São Paulo: CETESB.

Correia, A.A., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, A.A.C., Oliveira, J.V. & Torres, J.B. (2009). Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com Nim. *Neotropical Entomology* **38**, 1-9.

Costa, J.B. (2007) *Avaliação ecotoxicológica de efluente de tratamento secundário de esgoto sanitário após desinfecção com ácido peracético, cloro, ozônio e radiação ultravioleta.* Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Costa, P.M., Diniz, M.S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T.A. & Costa, M.H., (2009). Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to

contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach. *Aquatic Toxicology* **92**, 202-212.

Crane, M., Sildanchandra, W., Kheir, R. & Callaghan, A. (2002). Relationship between biomarker activity and developmental endpoints in *Chironomus riparius* Meigen exposed to an organophosphate insecticide. *Ecotoxicology Environmental Safety* **53**, 361–369.

Credland, P.F. & Phillips, A.D. (1974). The neuro-endocrine system of *Chironomus riparius* (Diptera). An introduction. *Entomologisk Tidskift* **95**, 49-57.

Credland, P.F. & Scales, M.D.C. (1976). The neurosecretory cells of the brain and suboesophageal ganglion of *Chironomus riparius*. *Journal of Insect Physiology* **22**, 633-642.

Credland, P.F. (1978). An ultrastructural study of the larval integument of the midge, *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae). *Cell & Tissue Research* **186**, 327–335.

Cruz-Landim, C. 2009. *Abelhas: Morfologia e Função dos Sistemas*. 1ed. São Paulo: UNESP.

Di Veroli, A., Goretti, E., Paumen, M.L., Kraak, M.H.S. & Admiraal, W. (2012a). Induction of mouthpart deformities in chironomid larvae exposed to contaminated sediments. *Environmental Pollution* **166**, 212-217.

Di Veroli, A., Selvaggi, R. & Goretti, E. (2012b). Chironomid mouthpart deformities as indicator of environmental quality: a case study in Lake Trasimeno (Italy). *Journal of Environmental Monitoring* **14**, 1473-1478.

Domingues, I., Agra, A.R., Monaghan, K., Soares, A.M.V.M. & Nogueira, A.J. A. (2010). Cholinesterase and glutathione S-transferase activities in freshwater

invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environmental Toxicology & Chemistry* **29**, 5–18.

Dornfeld, C.B. (2006). *Utilização de Chironomus sp (Diptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais*. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Dornfeld, C.B., Espíndola, E.L.G., Fracácio, R., Rodrigues, B.K. & Novelli, A. (2006). Comparação de bioensaios laboratoriais e “in situ” utilizando *Chironomus xanthus* na avaliação da toxicidade de sedimentos do rio Monjolinho (São Carlos, SP). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* **2**, 161-165.

Environmental Canada. (1990). *Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants*. Repont EPS 1/RM/12.

Esteves, F.A. (1988). *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro: Editora Interciência/FINEP.

Fent, K. & Meier, W. (1994). Effects of triphenyltin on fish early life stages. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **27**, 224-223.

Ferreira, R.A.C. (2010). *Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de Malpighi de operárias adultas de Scaptotrigona postica (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico*. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

Fonseca, A.L. & Rocha, O. (2004). Laboratory cultures of the native species *Chironomus xanthus* Rempel (1939) (Diptera-Chironomidae). *Acta Limnologica Brasiliensia* **16**, 153-161.

Fonseca, A.L. (1997). *Avaliação da qualidade da água na bacia do Rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados*. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Forbes, V.E., Palmqvist, A. & Bach, L. (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 272-280.

Fox, J. (2003). Effect Displays in R for Generalised Linear Models. *Journal of Statistical Software* **8**, 1-27.

Frouz, J. (1997). The effect of vegetation patterns on oviposition habitat preference: a driving mechanism in terrestrial chironomid (Diptera: Chironomidae) succession? *Researches in Population Ecology* **39**, 207-213.

Garban, B., Blanchoud, H., Motalay-Massei, A., Chevreuil, M. & Ollivon, D. (2002). Atmospheric bulk deposition of PAHs onto France: trends from urban to remote sites. *Atmospheric Environment* **36**, 5395-5403.

Gouin, F. (1946). Recherches morphologiques sur le mésentéron et le proctodeum des larves de Chironomides. *Archives de zoologie expérimentale et générale* **84**, 335-374.

Guaratini, T., Cardozo, K.H.M., Pavanelli, D.D., Colepicolo, P. & Pinto, E. (2008). In: *Fundamentos de Toxicologia*, Oga, S., Camargo, M.M.A. & Batistuzzo, J.A.O. (Eds), pp 127-141. 3ª ed. São Paulo: Atheneu.

Ha, M. & Choi, J. (2008). Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): A potential biomarker for ecotoxicity monitoring. *Chemosphere* **71**, 1928-1936.

Hakim, R.S., Baldwin, K., Smagghe, G. (2010). Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review Entomology* **55**, 593–608.

Hall, M., Forrester, L.M., Parker, D.K., Grover, P.L. & Wolf, C.R. (1989). Relative contribution of various forms of cytochrome P450 to the metabolism of benzo[a]pyrene by human liver microsomes. *Carcinogenesis* **10**, 1815-1821.

Halpern, M., Gasith, A., Bresler, V.M. & Broza, M. (2002). The protective nature of *Chironomus luridus* larval tubes against copper sulfate. *Journal of Insect Science* **2**, 1-5.

Holmgren, N. (1904). Zur morphologie des Insektenkopfes. I. Zum Metameren Aufbau des Kopfes der *Chironomus* larvae. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* **76**, 439-477.

Hothorn, T., Bretz, F. & Westfall, P. (2008). Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal* **50**, 346-363.

Jacob, J. & Jurand, A. (1965). Electron microscope studies on salivary gland cells. V. The cytoplasm of *Smittia parthenogenetica* (Chironomidae). *Insect Physiology* **11**, 1337-1343.

Jacob, J. & Sirlin, J.L. (1964). Electron microscope studies on salivary gland cells. IV. The nucleus of *Smittia parthenogenetica* (Chironomidae) with special reference to the nucleolus and the effects of actinomycin thereon. *Ultrastructure Research* **11**, 315-328.

Jarjal, M.S. (1988). Fine structure of the Malpighian tubules of *Chironomus* larva in relation to glycogen storage and fate of hemoglobin. *Tissue & Cell* **20** 355–380.

Jarial, M.S. (1995). Fine structure of anal papillae in larval chironomids, *Chironomus tentans* (Diptera) with reference to ionic and macromolecular transport. *Invertebrates Biology* **114**, 324-333.

Jarial, S.J. & Engstrom, L.E. (1997). Formation and ultrastructure of the peritrophic membrane in larval midge *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Zoological Science* **14**, 907–916.

Jonusaite, S., Kelly, S.P. & Donini, A. (2011). The physiological response of larval *Chironomus riparius* (Meigen) to abrupt brackish water exposure. *Journal of Comparative Physiology B* **181**, 343-352.

Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica*. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Keizer, J., D'Agostinho, G., Nagel, R., Volpe, T., Gnemi, P. & Vittozzi, L. (1995). Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species. *The Science of the Total Environment* **171**, 213-220.

Knie, J.L.W. & Lopes, E.W.B. (2004). *Testes ecotoxicológicos. Métodos, técnicas e aplicações*. FATMA/GTZ: Florianópolis.

Krull, M & Barros, F. (2012). Key Issues in Aquatic Ecotoxicology in Brazil: A Critical Review. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* **7**, 57-66.

Kümmel, G. (1969). Zur Feinstruktur der corpora allata von *Chironomus*. *Zoologischer Anzeiger Suppl* **32**, 123-135.

Lee, S.B. & Choi, J. (2006). Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 3006–3014.

Lee, S.B. & Choi, J. (2007). Effects of bisphenol A and ethynyl estradiol exposure on enzyme activities, growth and development in the fourth instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Ecotoxicology Environmental Safety* **68**, 84–90.

Lotufo, G.R. & Fleeger, J.W. (1996). Toxicity of sediment-associated Pyrene and Phenanthrene to *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta: Tubificidae). *Environmental, Toxicology and Chemistry* **15**, 1508-1516.

Lycett, G.J., McLaughlin, L.A., Ranson, H., Hemingway, J., Kafatos, F.C., Loukeris, T.G. (2006). Anopheles gambiae P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. *Insect Molecular Biology* **15**, 321–327.

Maier, K.J., Kosalwat, P. & Knight, A.W. (1990). Culture of *Chironomus decorus* (Diptera: Chironomidae) and the Effect of Temperature on its Life History. *Environmental Entomology* **19**, 1681-1688.

McLachlan, A.J. (2012). Phenotypic and Adaptation in a Holometabolous Insect: The Chironomid Midge. *International Scholarly Research Network Zoology*, 1-8

Meire, R.O., Azeredo, A. & Torres, J.P.M. (2007). Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecologia Brasiliensis* **11**, 188-201.

Meyers, M.S. & Fournie, J.W. (2002). Histopathological Biomarkers as Integrators of Anthropogenic and Environmental Stressors. *Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress*, 221-287.

Miall, L.C. & Hammond, A.R. (1900). *The Structure and Life History of the Harlequin Fly*. Oxford.

Moody, J., Freeman, J., Doerge, D. & Cerniglia, C. (2001). Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 1476–1483.

Morais, G.S. (2011). *Efeito do fenantreno na biologia de Chironomus sancticaroli Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae)*. Monografia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Nardi, J.B., Miller, L.A., Bee, C.M., Lee, R.E. & Denlinger, D.L. (2009). The larval alimentary canal of the Antarctic insect, *Belgica antarctica*. *Arthropod Structure & Development* **38**, 377–389.

Nasiruddin, M. & Mordue-Luntz A.J. (1993). The effect of azadirachtin on the midgut histology of the locusts *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. *Tissue & Cell* **25**, 875–884.

Nebeker, A.V., Cairns, M.A., Gakstatter, J.H., Malueg, K.W., Schuytema, G.S. & Krawczyk, D.F. (1984). Biological methods for determining toxicity of contaminated freshwater sediments to invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* **3**, 617–630.

Neff, J.M. (1979). *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment - sources, fates and biological effects*. London, England: Applied Science Publishers.

Neff, J.M. (1984). Bioaccumulation of organic micropollutants from sediments and suspended particulates by aquatic animals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **319**, 132-136.

Netto, A.D.P., Dias, J.C.M., Arbilla, G.; Oliveira, L.F. & Barek, J. (2000). Avaliação da contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos e seus derivados nitratos: Uma revisão metodológica. *Química Nova* **23**, 765-773.

Odume, O.N., Muller, W.J., Palmer, C.G. & Arimoro, F.O. (2012). Mentum deformities in Chironomidae communities as indicators of anthropogenic impacts in Swartkops River. *Physics and Chemistry of the Earth* (in press).

Oliveira, M., Pacheco, M. & Santos, M.A. (2007). Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following short-term exposure to phenanthrene. *Chemosphere* **66**, 1284–1291.

Page, D.S., Boehm, P.D., Douglas, G.S., Bence, A.E., Burns, W.A. & Mankiewicz, P.J. (1999). Pyrogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in sediments record past human activity: A case study in Prince William Sound, Alaska. *Marine Pollution Bulletin* **38**: 247-266.

Panov, A.A. (1979). Brain neurosecretory cells and their axon pathways in the larva of *Chironomus plumosus* L. (Diptera: Chironomidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **8**, 203-212.

Pery, A.R.R., Ducrot, V., Mons, R. & Garric, J. (2003). Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyse growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology* **65**, 281–292.

Pery, A.R.R., Geffard, A., Conrad, A., Mons, R. & Garric, J. (2008). Assessing the risk of metal mixtures in contaminated sediments on *Chironomus riparius* based on cytosolic accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **71**, 869-873.

Pierson, M. (1956). Contribution a l'histologie de l'appareil digestif de *Chironomus plumosus* L. *Annales des sciences naturelles zoologie et biologie animale* **18**, 107-122.

Pillot, H.K.M.M. (2009). Chironomidae Larvae of the Netherlands and adjacent lowlands: biology and ecology of the Chironomini. KNNV Publishing, Zeist.

Possompès, B. (1938). *Élimination de l'hémoglobine chez les Diptères au cours de la métamorphose*. Diplôme d'Études supérieures, Fac. Sc. Paris.

Possompès, B. (1946). Les glandes endocrines post-cérébrales des Diptères. I. Etude chez l'alarve de *Chironomus plumosus* L. *Bulletin de la Société zoologique de France* **71**, 99-109.

Possompès, B. (1948). Les corpora cardíaca de la larve de *Chironomus plumosus* L. *Bulletin de la Société zoologique de France* **73**, 202-206.

Printes, L.B., Espíndola, E.L.G. & Fernandes, M.N. (2007). Biochemical biomarkers in individual larvae of *Chironomus xanthus* (Rempel, 1939) (Diptera, Chironomidae). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* **2**, 53–60.

Printes, L.B., Fernandes, M.N. & Espíndola, E.L.G. (2011). Laboratory measurements of biomarkers and individual performances in *Chironomus xanthus* to evaluate pesticide contamination of sediments in a river of southeastern Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**, 424-430.

Pusceddu, F.H. (2009). *Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados de água doce com ênfase em ensaios com sedimento marcado ("spiked sediment")*. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo, São Paulo.

R Development Core Team. (2011). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL

Rey, D., Long, A., Pautou, M.P. & Meyran, J.C. (1998). Comparative histopathology of some Diptera and Crustacea of aquatic alpine ecosystems,

after treatment with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **88**, 255–63.

Rey, D., Pautou, M.P. & Meyran, J.C. (1999). Histopathological effects of tannic acid on the midgut epithelium of some aquatic diptera larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* **73**, 173-181.

Richardi, V.S., Rebechi, D., Aranha, J.M.R e Navarro-Silva, M.A. (2012). Determination of larval instars in *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae) using novel head capsule structures. *ZOOLOGIA* (in press)

Rose, N.L. & Rippey, B. (2002). The historical record of PAH, PCB, trace metal and fly-ash particle deposition at a remote lake in north-west Scotland. *Environmental pollution* **117**, 121-132.

Rosenberg, D.M., & Resh V.H. (1993). Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. In: *Freshwater Biology and Benthic Macroinvertebrates*, Rosenberg, D.M. & Resh, V.H., (Eds.), pp 1–9. Chapman & Hall, New York.

Sæther, O.A. & Ekrem, T. (2003). Biogeography of Afrotropical Chironomidae (Diptera), with special reference to Gondwanaland. *Cimbebasia* **19**, 175–191.

Sales, S.C.M. (2009). *Reavaliação ecotoxicológica da qualidade da água e do sedimento do reservatório da Pampulha (MG) e seus principais tributários*. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Sanseverino, A.M. & Nessimian, J.L. (2008). Assimetria flutuante em organismos aquáticos e sua aplicação para avaliação de impactos ambientais. *Oecologia Brasiliensis* **12**, 382-405.

Schin, K., Laufer., H. & Carr, E. (1977). Cytochemical and electrophoretic studies of haemoglobin synthesis in the fat body of a midge, *Chironomus thummi*. *Journal Insect Physiology* **23**, 1233-1242.

Scudeler, E.L. & Santos, D.C. (2013). Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). *Micron* **44**, 125-132.

Seidman, L.A., Bergtrom, G. & Remsen, C.C. (1986). Structure of the larval midgut of the fly *Chironomus thummi* and its relationship to sites of cadmium sequestration. *Tissue & Cell* **18**, 407-418.

Servia, M.J., Cobo, F. & González, M.A. (2004). Multiple trait analysis of fluctuating asymmetry levels in anthropogenically and naturally stressed sites: A case study using *Chironomus riparius* (Meigen, 1804) larvae. *Environmental Monitoring and Assessment* **90**, 101-112.

Sibley, P.K., Ankley, G.T. & Benoit, D.A. (2001). Factors affecting reproduction and the importance of adult size on reproductive output of the midge *Chironomus tentans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 1296–1303.

Silva, A.M. (2005). *Avaliação ecotoxicológica do agrotóxico permetrina através de ensaios de toxicidade com invertebrados aquáticos*. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Strixino, G. & Trivinho-Strixino, S. (1985). A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (DIPTERA: CHIRONOMIDAE). *Revista Brasileira de Zoologia* **3**, 177-180.

Strixino, S. T. & Strixino, G. (1981). Nova espécie do gênero *Chironomus* Meigen do sul do Brasil (Diptera: Chironomidae). *Revista Brasileira de Entomologia*. **25**, 333-340.

Trivinho-Strixino, S. & Strixino, G. (1982). Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae). *Revista Brasileira de Entomologia* **26**, 183-189.

Trivinho-Strixino, S. (2011a). *Larvas de Chironomidae. Guia de Identificação*. São Carlos, Depto Hidrobiologia/Lab. Entomologia Aquática/UFScar, 371p.

Trivinho-Strixino, S. (2011b). Chironomidae (Insecta, Diptera, Nematocera) do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropica* **11**, 1-10.

U.S. Environmental Protection Agency. (1993). *Sediment quality criteria for the protection of benthic organisms: Phenanthrene*. EPA 822/R/93/014. Washington, DC.

United States Environment Protection Agency – EPA. (1986). *Quality criteria for water*. EPA 440/5-86-001. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.

United States Environmental Protection Agency – USEPA. (2000). *Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates*. 2ed. Washington, D.C.: USEPA. (EPA – 600-99/064).

United States Environmental Protection Agency - USEPA. (2005). *Procedures for the Derivation of Equilibrium Partitioning Sediment Benchmarks (ESBs) for the Protection of Benthic Organisms: Metal mixtures (Cadmium, Copper, Lead, Nickel, Silver, and Zinc)*, USEPA: Washington.

United States Environmental Protection Agency- USEPA. (2008). *Priority Chemicals*. In: <http://www.epa.gov/osw/hazard/wastemin/priority.htm>

Vafopoulou-Mandalos, X. & Laufer, H. (1984). Tissue-specificity of hemoglobin synthesis: localization of heme synthesis in the subepidermal fat body of *Chironomus thummi* (Diptera). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **1**, 191-197.

Vallenduuk, H.J. & Pillot, H.K.M.M. (2007). *Chironomidae larvae of the Netherlands and Adjacent Lowlands: general ecology and Tanypodinae*. KNNV Publishing, Zeist.

Van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**, 57-149.

Varanasi, U., Stein, J.E. & Nishimoto, M. (1989). Biotransformation and disposition of PAH in fish. In: *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, Varanasi, U. (Ed.), pp. 93-149. CRC Press, Boca Raton, FL.

Venables, W.N. & Ripley, B.D. (2002). *Modern Applied Statistics with S*. 4th ed. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0.

Verschueren, K. (2001). *Handbook of environmental data of organic chemicals*. 4th ed. Chichester, England. Wiley.

Vignon, P. (1901). Recherches sur les épithéliums. *Archives de zoologie expérimentale et générale*. **3**, 371-715.

Viveiros, W. (2012). *Chironomus sancticaroli – do cultivo em laboratório ao ensaio ecotoxicológico com amostras ambientais de sedimento*. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Weber, R.E. & Vinogradov, S.N. (2001). Non-vertebrate hemoglobins: function and molecular adaptation. *Physiological reviews* **81**, 569–628.

Wigglesworth, V.B. (1972). *The principle of Insect Physiology*. 7th ed, Chapman and Hall, London.

Wood, J.M. (1974). Biological cycles for toxic elements in the environment. *Science* **183**, 1049-1052.

World Health Organization (WHO). (1993). International Programme on Chemical Safety (IPCS) – *Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Geneva. Disponível em: <<http://www.who.int>> Acesso em: 23/10/2021.

Wu, L.L., Chen, L., Zhang, Y. L., Li, J.H. & Zhao, J.F. (2007). Effects of phenanthrene toxicity on histopathology of *Brachydanio rerio* gill and liver. *Chinese Journal of Ecology* **26**, 688–692.

Zagatto, P.A. (2008). Ecotoxicologia. In: *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*, Zagatto, P.A. & Bertoletti, E. (Eds), pp 1-13. 2^a ed. São Carlos, Brasil: Rima.

Zee, H. C & Pai, S. (1944). *Corpus allatum* and *corpus cardiacum* in *Chironomus* sp. *The American Naturalist* **78**, 472-477.